

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK SAMBILOTO  
(*ANDROGRAPHIS PANICULATA*) TERHADAP KEMATIAN SEL  
ADENOKARSINOMA MAMMA MENCIT C3H (IN VITRO)**

*In Vitro Studies on The Effects of Sambiloto (*Andrographis paniculata*)  
Extract on The Mortality of Adenocarcinoma Mammae Cells of C3H Mice*

**TESIS**

**Diajukan kepada Pengelola Program Magister Ilmu Biomedik  
Universitas Diponegoro untuk memenuhi syarat guna  
Memperoleh Derajat Sarjana S2 Magister**



Diajukan Oleh :

**NUGRAHANINGSIH WH  
NIM. G4A000008**

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
PROGRAM PASCASARJANA UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
APRIL 2003**

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK SAMBILOTO  
( *ANDROGRAPHIS PANICULATA* ) TERHADAP KEMATIAN SEL  
ADENOKARSINOMA MAMMA MENCIT C3H ( IN VITRO)**

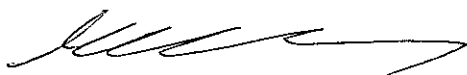
*In Vitro Studies on Effect of Sambiloto ( Andrographis paniculata )  
Extract on Mortality of Adenocarcinoma Mammae Cells of C3H Mice*

Disusun oleh :

NAMA : NUGRAHANINGSIH WH  
NIM : G4A000008

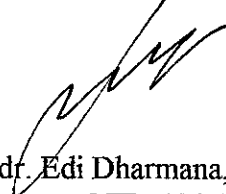
Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji Tesis pada tanggal  
16 April 2003 dan telah dinyatakan memenuhi syarat untuk diterima

Pembimbing I



( Prof. DR.dr. Tjahjono, SpPA(K), FIAC )  
NIP 130 368 076

Pembimbing II



( dr. Edi Dharmana, MSc, Ph.D )  
NIP. 130 529 451

Mengetahui

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik  
Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro



( dr. H. Soebowo, SpPA )  
NIP.130 352 549



UPT-PUSTAK-UNDIP	
No. Daft:...	2250/T/MB
Tgl. ....	12 Feb 10 4

1e1

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 15 April 2003

Nugrahaningsih WH

## RIWAYAT HIDUP

Nama : Nugrahaningsih Wahyu Harini

Tempat/tanggal lahir : Klaten, 9 Juli 1969

Pekerjaan : Dosen Jurusan Biologi FMIPA  
Universitas Negeri Semarang

Alamat : Perumahan Trangkil Sejahtera B-36  
Sukorejo, Gunungpati, semarang

### Riwayat Pendidikan

Jenjang Pendidikan	Tempat	Lulus Tahun	Keterangan
SD	Klaten	1981	Jurusan A2
SMP	Klaten	1984	
SMA	SMA 2 Klaten	1987	
S1	FK UNDIP	1994	
S2	PPS Biomedik UNDIP	2003	Masuk th 2000

### Riwayat Pekerjaan

Tahun	Tempat	Keterangan
Pebruari 1995- Januari 1998	RSUD dr. Soewondo Kendal	Dokter PTT
Pebruari 1998- sekarang	Jurusan Biologi FMIPA UNNES	Dosen tetap

## KATA PENGANTAR

Kanker payudara merupakan salah satu masalah kesehatan dimana terapi yang ada sampai saat ini masih belum memuaskan. Penggunaan bahan dan obat tradisional pada masyarakat untuk mengobati kanker memberikan hasil yang cukup menggembirakan. Akan tetapi penggunaan obat tradisional tersebut belum didukung oleh data-data ilmiah yang cukup sehingga seringkali menimbulkan keraguan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak sambiloto ( *Andrographis paniculata* ) pada sel kanker payudara dari mencit C3H yang dilakukan secara in vitro. Hasil penelitian ini bermanfaat dalam memberikan informasi lebih dalam tentang efek obat tradisional khususnya sambiloto.

Penelitian ini dapat terlaksana karena bantuan dari berbagai pihak yang telah memberikan bantuan baik moril maupun material. Untuk itu kami ucapkan terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan ijin, dorongan moral dan bantuan finansial untuk melanjutkan studi S2
2. Prof. dr. Soebowo, SpPA selaku ketua program studi Magister Ilmu Biomedik yang selalu mendorong untuk menyelesaikan studi tepat waktu
3. Prof. DR. dr. Tjahjono, SpPA(K), FIAC dan dr. Edi Dharmana, MSc, PhD, yang telah membimbing saya dengan penuh perhatian dan kesabaran

4. Tauhid Nur Azhar, MMc,Mmed yang sangat besar bantuannya mulai dari mencari ide penelitian, penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian sampai selesainya penelitian dan studi.
5. dr. Mpu Kanoko,SpPA, Dra. Puspita Eka Wuyung, MS dan Drs. Kusmardi,MS dari bagian Patologi Anatomi Universitas Indonesia yang telah memberikan bimbingan tehnik laboratorium selama pelaksanaan penelitian
6. dr. Chodijah, dr. Tri Laksana N, drg. Gunawan, dr. Hadi dan teman-teman angkatan 2000 yang selalu kompak dan saling memberi dukungan.
7. Suami dan anak saya, Drs. Ngabiyanto,MSi dan Arka Yanitama sebagai pendukung utama yang selalu mendoakan saya hingga semuanya berjalan dengan lancar.
8. Semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu-persatu yang telah memberi dorongan dan bantuan baik berupa moril maupun material sehingga penelitian ini dapat berjalan lancar.

Saya menyadari masih banyak kekurangan dalam penelitian ini. Namun kekurangan-kekurangan ini merupakan bahan untuk perbaikan di masa yang akan datang. Akhir kata mudah-mudahan penelitian thesis ini dapat memberikan manfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan dan berguna untuk masyarakat, almamater maupun untuk pengalaman pribadi saya sendiri.

Semarang, 15 April 2003

## DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman judul .....	i
Lembar pengesahan.....	ii
Lembar pernyataan.....	iii
Riwayat hidup.....	iv
Kata Pengantar.....	v
Daftar isi .....	vii
Daftar tabel.....	ix
Daftar gambar.....	x
Daftar Lampiran.....	xi
Abstrak.....	xii
<b>BAB I : PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
Latar Belakang.....	1
Perumusan Masalah.....	7
Tujuan Penelitian.....	7
Manfaat Penelitian.....	7
<b>BAB II: TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>9</b>
Patologi Keganasan.....	10
Imunologi Tumor.....	14
Apoptosis.....	19
Sambiloto ( <i>Andrographis paniculata</i> ) Sebagai Antikanker.....	28
<b>BAB III: KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP.....</b>	<b>32</b>
Landasan Teori.....	32
Kerangka Teori.....	33
Kerangka Konsep.....	34
Hipotesis.....	35

BAB IV:METODOLOGI PENELITIAN.....	36
Rancangan Penelitian.....	36
Populasi dan Sampel.....	37
Variabel Penelitian.....	37
Bahan.....	38
Alat.....	39
Waktu dan tempat penelitian.....	40
Prosedur pengumpulan data.....	40
Alur Kerja.....	42
Pemeriksaan.....	42
Analisa Data.....	47
BAB V : HASIL PENELITIAN.....	48
Kematian Sel.....	48
Fagositosis Makrofag.....	57
BAB VI: PEMBAHASAN.....	61
Kematian Sel.....	61
Fagositosis Makrofag.....	64
BAB VII:KE SIMPULAN DAN SARAN.....	66
BAB VIII. RINGKASAN.....	67
DAFTAR PUSTAKA.....	70
LAMPIRAN.....	73



## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Jumlah sel adenokarsinomamma yang mengalami kematian.....	49
Tabel 2. Hasil uji beda kematian sel adenokarsinoma mamma dengan uji Anova	50
Tabel 3. Hasil uji Post Hoc sel adenokarsinoma mamma dengan uji Tukey.....	50
Tabel 4. Jumlah sel adenokarsinoma mamma yang mengalami apoptosis.....	52
Tabel 5. Hasil uji beda sel apoptosis dengan uji Anova.....	53
Tabel 6. Hasil uji Post Hoc sel yang apoptosis dengan uji Tukey.....	53
Tabel 7. Jumlah sel adenokarsinoma mamma yang mengalami nekrosis.....	54
Tabel 8. Hasil uji beda sel yang apoptosis dengan uji Anova.....	55
Tabel 9. Hasil uji post Hoc sel yang apoptosis dengan uji Tukey.....	56
Tabel 10. Jumlah makrofag yang memfagosit badan apoptosis.....	57
Tabel 11. Hasil uji beda fagositosis makrofag dengan uji Anova.....	58
Tabel 12. Hasil uji Post Hoc fagositosis makrofag dengan uji Tukey.....	59

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Induksi apoptosis oleh sel NK.....	17
Gambar 2. Perbedaan morfologi apoptosis dan nekrosis.....	20
Gambar 3. Pembentukan heterodimer antara Bcl-2 dengan Bax mengisi apoptosis .....	23
Gambar 4. Tumbuhan sambiloto <del>f</del> ( <i>andrographis paniculata</i> ).....	28
Gambar 5. Boxplot jumlah kematian sel adenokarsinoma mamma.....	49
Gambar 6. Boxplot jumlah sel adenokarsinoma mamma yang apoptosis.....	52
Gambar 7. Boxplot jumlah sel adenokarsinoma mamma yang nekrosis.....	55
Gambar 8. Boxplot jumlah makrofag yang memfagosit badan apoptosis.....	58
Gambar 9. Sel adenokarsinoma mamma yang dikultur dalam medium RPMI.....	73
Gambar 10. Sel adenokarsinoma mamma yang mengalami apoptosis.....	74
Gambar 11. Makrofag yang memfagosit badan apoptosis.....	75

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Foto-foto penelitian.....	73
Lampiran 2. Output hasil analisa statistik.....	76
Lampiran3. Surat ijin penelitian .....	96
Lampiran 4. Sertifikasi ekstrak sambiloto.....	97

## ABSTRAK

**LATAR BELAKANG:** Kanker payudara adalah jenis keganasan yang sering dijumpai pada wanita. Di Amerika kanker payudara menempati urutan kedua sebagai penyebab kematian akibat kanker pada wanita. Selain onkogen dan gen penekan tumor, hilangnya kontrol atas proses apoptosis sel berperan dalam proses terjadinya kanker. Kehilangan kontrol apoptosis akan menyebabkan sel berproliferasi tanpa batas kematian. Apoptosis merupakan suatu program yang mengatur kematian sel – sel yang tidak diinginkan tanpa menimbulkan reaksi radang sehingga apoptosis merupakan cara kematian sel yang sangat diharapkan. Penyembuhan kanker dengan terapi yang ada saat ini belum memberikan hasil yang memuaskan. Beberapa terapi alternatif untuk menyembuhkan kanker mulai dikembangkan dan diteliti untuk mendapatkan cara atau obat yang relatif aman dan terjangkau. Salah satu cara pengobatan tradisional adalah menggunakan obat tradisional. Ekstrak sambiloto ( *Andrographis paniculata* ) mengandung zat aktif yang disebut andrografolid yang dapat berfungsi sebagai kemopreventif terhadap toksisitas karsinogen dan antikanker pada khorioikarsinoma dan mola hidatidosa. Tujuan penelitian ini mengevaluasi efek *Andrographis paniculata* pada kematian sel kanker.

**METODE PENELITIAN :** Desain penelitian yang digunakan adalah *Post-test randomized control group*. Sel kanker yang digunakan adalah sel kanker payudara jenis adenokarsinoma yang dikultur dari mencit strain C3H yang diperoleh dari bagian Patologi Anatomi FK UI. Penelitian dilakukan dengan memberikan berbagai dosis ( 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml dan 100 mg/ml) ekstrak *Andrographis paniculata*. Sel yang mengalami kematian, apoptosis dan nekrosis dilihat dengan pewarnaan ganda menggunakan acridin orange dan propidium iodide. Penghitungan dilakukan

menggunakan mikroskop fluoresen. Selain itu dilihat juga jumlah makrofag yang memfagosit badan apoptosis yang ditambahkan pada sumuran berisi makrofag.

**HASIL PENELITIAN :** Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* dapat meningkatkan kematian sel adenokarsinoma mamma baik secara apoptosis maupun nekrosis. Demikian pula jumlah makrofag yang memfagosit badan apoptosis menunjukkan perbedaan bermakna bila dibandingkan dengan kontrol. Analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada jumlah kematian sel, sel yang apoptosis, yang nekrosis dan fagositosis makrofag dengan nilai p masing-masing  $< 0,0001$

**KESIMPULAN :** Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* dapat meningkatkan kematian sel adenokarsinoma mamma baik secara apoptosis maupun nekrosis dan fagositosis makrofag.

**Kata kunci :** *Andrographis paniculata* – kematian sel – apoptosis - nekrosis

## ABSTRACT

**BACK GROUND :** Breast cancer is the most common cancer and the second leading cause of cancer mortality among woman in United States. Cell altered beyond repair by normal mechanism or cell that have complete their programmed biological function begin the apoptosis process. Oncogene, tumor suppressor gene and lost of apoptotic control was an essential component of the developmental abnormal cells, and the underlying cause of the resulting malignancies cell. Cancer therapies was currently designed to arrest and kill cancer cell, however the normal cells were also destroyed. Chemotherapy and radiation therapy kill dividing cells, both normal or cancer cells. Thus, the use of radiation and chemotherapy were limited by its toxicity to normal cell. Traditional medicine is one of biologic therapies in order to decrease the side effect of cancer therapies. Medicinal herb is one of biologic therapies against cancer cells. The component of *Andrographis paniculata* extract such as andrografide and andrografolide have a chemopreventive effect. Andrografolide have a good therapeutic response in choriocarcinoma and hydatid mole. The aims of this research is to explore the effect of *Andrographis paniculata* extract on the mechanism of mortality of adenocarcinoma mammae cell.

**METHOD:** The design of this research was *post-test randomized control group*. Adenocarcinoma mammae cells of C3H mice were cultured in CO incubator for 3 days. Various doses ( 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml and 100 mg/ml ) of *Andrographis paniculata* extract were added to each well. Mortality, apoptotic and necrotic cell were

counted after 24 hours. Double staining of acridine orange and propidium iodide were used under fluorescence microscope to differentiate apoptotic and necrotic cell.

RESULT : Cell counting showed increased of cell death, apoptotic cell, necrotic cell and macrophage phagocytosis. Anova analysis showed that the adding of *Andrographis paniculata* had a significant different to increase of cell death, apoptotic cell and necrotic cells compared with controle ( p value < 0,0001).

CONCLUSION: This results prove that *Andrographis paniculata* extract induce mortality of adenocarcinoma mammae cell trough both apoptosis and necrosis mechanism and also increases the phagocyte actions of macrophage.

Key word : *Andrographis paniculata* – apoptosis- adenocarcinoma mammae

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1. LATAR BELAKANG

Kanker payudara adalah satu jenis keganasan yang sering dijumpai pada wanita.<sup>1,2</sup> Tahun 1993 dilaporkan ada 183.000 kasus di seluruh dunia. Pada tahun tersebut satu dari tiga kasus baru keganasan pada wanita adalah kanker payudara. Insiden kanker payudara di Indonesia ada 100 kasus per 10.000 penduduk per tahun. Di Kodya Semarang tercatat ada 231 kasus selama kurun waktu 4 tahun antara tahun 1990-1993.<sup>2</sup> Jumlah ini menduduki urutan kedua kanker pada wanita setelah kanker leher rahim. Di Amerika kanker payudara menempati urutan kedua sebagai penyebab kematian akibat keganasan pada wanita.<sup>1</sup>

Sampai saat ini berbagai jenis terapi telah diupayakan untuk penyembuhan kanker. Terapi bertujuan untuk membunuh sel-sel kanker dan meningkatkan kualitas hidup penderita kanker payudara. Terapi kanker yang sudah dilakukan antara lain terapi operatif, kemoterapi dengan sitostatik dan radioterapi.<sup>3</sup> Ketiga jenis terapi tersebut baik sendiri maupun kombinasi menimbulkan masalah dengan efek sampingnya yang cukup berat. Penyembuhan kanker dengan terapi yang ada belum memberikan hasil yang memuaskan. Terapi operatif dengan mengangkat jaringan kanker dan sekitarnya, selain bersifat invasif juga tidak efektif apabila kanker telah bermetastase ke tempat yang jauh. Sitostatika dan radioterapi yang bekerja pada penghambatan siklus sel tidak bersifat selektif sehingga tidak hanya sel kanker saja yang mengalami kerusakan melainkan juga sel-sel yang normal.<sup>3</sup>

UPT-PUSTAK-UNBIP



Dalam dekade terakhir ini pengobatan kanker dalam masyarakat mulai bergeser kepada pengobatan alternatif. Berbagai ragam pengobatan alternatif seperti gurah, pijat refleksi, akupunktur dan berbagai jamu serta ramuan tradisional mulai digunakan.<sup>4</sup> Dalam masyarakat Indonesia penggunaan pengobatan tradisional sudah berlangsung lama dan turun-temurun. Pengobatan tradisional adalah pengobatan dan atau perawatan dengan cara, obat dan pengobatannya yang mengacu pada pengalaman dan ketrampilan turun-temurun dan diterapkan sesuai dengan norma yang berlaku dalam masyarakat. Pengobatan tradisional merupakan salah satu upaya pengobatan dan atau perawatan cara lain di luar ilmu kedokteran atau ilmu keperawatan.<sup>5</sup>

Salah satu cara pengobatan tradisional adalah menggunakan obat tradisional. Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun-temurun telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengalaman.<sup>5</sup> Berbagai bahan obat tradisional yang digunakan masyarakat dalam mengobati kanker antara lain kunir putih, mengkudu, ciplukan, meniran, sambiloto, daun dewa dan lain-lain.<sup>4</sup>

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) adalah salah satu jenis tumbuhan yang digunakan masyarakat untuk pengobatan. Tumbuhan ini diperkirakan berasal dari India dan menyebar ke Asia Tenggara termasuk Indonesia. *Andrographis paniculata* dapat tumbuh dengan baik pada daerah dataran rendah sampai ketinggian 700 m dpl. Tumbuh secara liar pada daerah yang terkena sinar matahari langsung atau setengah ternaungi. *Andrographis paniculata* termasuk satu jenis terna yang tumbuh tegak, mempunyai banyak cabang berbentuk segi empat, daun tunggal berhadapan dan berbentuk lanset

dengan tepi rata, ujung dan pangkal daun runcing.<sup>6</sup> Bunga berwarna putih, kecil dan buah lonjong seperti kapsul dengan biji gepeng. Berbunga dan berbuah pada musim kemarau, kemudian mengering dan bersemi lagi pada musim hujan dengan daun yang lebat.<sup>7</sup>

Penggunaan *Andrographis paniculata* sebagai obat tradisional cukup luas dan belum ada laporan kasus keracunan yang diakibatkan konsumsi *Andrographis paniculata*. *Andrographis paniculata* mempunyai rasa yang sangat pahit. Meskipun begitu masyarakat biasanya menggunakannya dalam bentuk air rebusan ( infusa ) untuk diminum. Khasiat *Andrographis paniculata* adalah sebagai obat untuk radang amandel, borok, penawar racun makanan dan racun ular, tifus, demam, gatal, kencing manis, desentri dan tonikum.<sup>8</sup> Berbagai penelitian yang sudah dilakukan menyatakan efek imunomodulator,<sup>4,9</sup> penghambat pembentukan tukak lambung,<sup>10</sup> anti inflamasi, anti diabetik,<sup>9</sup> dan anti tumor pada keganasan tropoblas seperti mola hidatidosa dan khorioikarsinoma.<sup>9,11</sup>

Walaupun dalam masyarakat telah digunakan sebagai antikanker, namun belum ada penelitian yang menjelaskan bagaimana mekanisme kerja dari *Andrographis paniculata* pada sel kanker termasuk kanker payudara. Hal ini menimbulkan keraguan pada sebagian besar masyarakat untuk menggunakan obat tradisional *Andrographis paniculata*. Berdasarkan pengalaman masyarakat secara empiris dan beberapa hasil penelitian yang sudah ada maka perlu digali lebih dalam mekanisme kerja *Andrographis paniculata* terhadap sel kanker.

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui efek *Andrographis paniculata* dalam meningkatkan kematian sel pada sel kanker payudara yang dilakukan secara in vitro. Selain itu juga untuk mengetahui apakah kematian yang disebabkan oleh

*Andrographis paniculata* adalah kematian apoptosis atau nekrosis dan peran makrofag dalam memfagosit sel-sel kanker yang telah mati.

## **1.2. PERUMUSAN MASALAH**

Permasalahan yang akan dicari jawabnya melalui penelitian ini adalah apakah pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* pada kultur sel adenokarsinoma mammae dapat meningkatkan kematian sel adenokarsinoma mamma ?

## **1.3. TUJUAN PENELITIAN**

### **1.3.1. Tujuan umum**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* terhadap kematian sel adenokarsinoma mamma dan fagositosis makrofag terhadap badan apoptosis secara in vitro.

### **1.3.2. Tujuan Khusus**

1.3.2.1. Membuktikan pengaruh pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* dalam meningkatkan kematian sel kanker adenokarsinoma mamma baik melalui jalur apoptosis maupun nekrosis yang dilakukan secara in vitro.

1.3.2.2. Membuktikan pengaruh pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* terhadap terjadinya fagositosis makrofag terhadap badan apoptosis.

#### 1.4. MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi lebih dalam tentang *Andrographis paniculata* sebagai obat tradisional untuk kanker. Kajian ilmiah tentang *Andrographis paniculata* ini akan menjelaskan mekanisme kerja ekstrak *Andrographis paniculata* pada sel kanker khususnya dalam penggunaannya sebagai penginduksi kematian sel dan pengenalan sel kanker sebagai antigen asing sehingga terjadi ikatan antara badan apoptosis dari sel kanker dengan makrofag dalam proses fagositosis. Hasil penelitian ini dapat dijadikan pertimbangan dalam upaya mencari alternatif pengobatan kanker yang relatif aman, murah dan dapat dipertanggungjawabkan.

## B A B 2

### TINJAUAN PUSTAKA

Selama beberapa tahun telah dibuktikan bahwa kerusakan dari DNA sel berhubungan dengan perubahan ke arah keganasan.<sup>12,13</sup> Perubahan ke arah keganasan tidak terjadi dalam satu langkah dan juga tidak terjadi karena kerusakan hanya satu gen saja.<sup>12</sup> Perubahan ke arah keganasan biasanya terjadi dalam jangka waktu yang cukup panjang dan melalui beberapa tahap yang sangat kompleks.

Secara prinsip keganasan terjadi karena sel kehilangan kontrol akan proliferasi dan kontrol akan mekanisme yang menjalankan program kematian sel yaitu apoptosis. Keberhasilan sel kanker untuk berkembang adalah melalui cara inaktivasi atau memotong mekanisme tersebut. Rata-rata dibutuhkan antara enam sampai tujuh mutasi untuk mengubah sel normal menjadi sel ganas. Ada tiga kelompok gen yang sering mengalami mutasi pada kanker yaitu 1) onkogen, 2) gen penekan tumor (*tumor suppressor gen*) dan 3) gen mutator.<sup>13-15</sup> Mutasi yang pertama akan menyebabkan mutasi kedua, mutasi kedua akan menyebabkan mutasi ketiga dan seterusnya sampai sel berubah menjadi ganas.<sup>15</sup>

DNA manusia dapat mengalami kerusakan oleh berbagai macam pemapar dari luar dan dapat pula terjadi secara spontan. Kerusakan DNA secara kimiawi terjadi secara kompleks. Respon seluler terhadap kerusakan ini meliputi sistem enzim yang mengkatalisa beberapa transformasi kimia yang penting pada metabolisme DNA. Selama

replikasi sel, ketepatan pasangan basa-basa nukleotida adalah mutlak. Ketidaktepatan antara basa-basa nukleotida tersebut bisa saja terjadi. Dalam keadaan normal akan segera terjadi perbaikan kerusakan DNA untuk memperbaiki ketidaktepatan tersebut. Walaupun DNA adalah molekul yang stabil, hilangnya sistem perbaikan pada DNA akan menyebabkan akumulasi kerusakan DNA. Pada mamalia didapatkan hubungan yang erat antara akumulasi dari mutasi gen dengan terjadinya kanker.

Pada manusia berkembangnya *Hereditary Non Polyposis Colon Cancer* (HNPCC) diketahui berhubungan dengan adanya akumulasi kerusakan pada DNA.<sup>12,14,15</sup> Sindrom ini timbul karena adanya defek pada sistem perbaikan ketidaktepatan pasangan basa. Dua gen yang paling sering mengalami kerusakan adalah *hMSH2* dan *hMLH1*. Kerusakan pada *hMSH2* dan *hMLH1* menyebabkan DNA menjadi tidak stabil dan sering terjadi akumulasi mutasi. Kurang lebih 10% dari kasus kanker payudara dihubungkan dengan adanya defek pada 2 gen yang dikenal sebagai *Brca1* dan *Brca2*. Wanita dengan defek pada *Brca1* dan *Brca2* mempunyai kecenderungan 80% berkembang menjadi kanker payudara.<sup>12-15</sup>

## 2.1. PATOLOGI KEGANASAN

### 2.1.1. Onkogen

Onkogen adalah suatu gen yang bekerja sebagai pemicu terjadinya proliferasi sel. Dalam sel normal onkogen berada pada bentuk yang tidak mengalami mutasi yang disebut *proto-onkogen*. *Proto-onkogen* ini dapat teraktivasi menjadi onkogen oleh berbagai keadaan seperti infeksi virus, radiasi dan berbagai pemapar kimia yang dapat menyebabkan mutasi.<sup>13,15</sup>

Onkogen adalah suatu bentuk gen termutasi yang meliputi berbagai fungsi normal sel. Ekspresi berlebihan yang tidak terkontrol dari faktor pertumbuhan mungkin menjadi penyebab adanya hiperproliferasi sel. Peran dari beberapa onkogen menjelaskan bahwa onkogen melakukan kontrol untuk memilih dan mengeluarkan fungsi yang akan diperkirakan menjadi pengganggu sel kanker. Ada lima kelompok yang dikenal yaitu : 1) sekresi faktor pertumbuhan seperti *sis*, 2) reseptor permukaan sel , contohnya, *erb* dan *fms*, 3) komponen dari sistem signal transduksi intrasel, pada *ras* dan *abl*, 4) protein inti yang terikat DNA, contohnya *myc* dan *jun*, 5) komponen dari sistem *cyclin*, *cyclin-dependent kinase* dan *kinase inhibitor* yang mengatur melalui siklus sel.

Pada sel kanker keberadaan *HER-2* atau sering disebut *c-erb-2/neu* sangat bermakna. Overekspresi dari *c-erb-2* ini diperkirakan berfungsi penting pada prognosis dan terapi. Onkogen ini teraktivasi oleh adanya amplifikasi onkogen normal yang bisa berjumlah ratusan *extracopy* . *Extracopy* dapat berada pada potongan kecil kromosom atau menginsersi kromosom normal.<sup>15</sup>

Selain oleh amplifikasi, onkogen juga dapat diaktivasi oleh mutasi titik. Sebagai contoh adalah gen *ras* yang mengkode protein p21 yang termasuk dalam signal transduksi reseptor protein G berpasangan. Mutasi titik pada pada gen *ras* sering ditemukan pada sel dari berbagai jenis keganasan termasuk kolon, paru , payudara dan kandung kencing. Mutasi ini akan menyebabkan penggantian asam amino yang mengurangi aktivitas GTPase dari protein RAS sehingga signal dari GTP-RAS menjadi lebih lambat.

### 2.1.2. Gen Penekan Tumor

Gen penekan tumor (*Tumor Suppressor Gene*) adalah gen yang berfungsi menghambat proliferasi sel. Gen ini sering disebut sebagai anti onkogen walaupun gen ini tidak bekerja sebagai penghambat onkogen. Terjadinya mutasi pada gen penekan tumor akan menyebabkan hilangnya penghambatan proliferasi sehingga sel akan berproliferasi secara berlebihan. Beberapa gen penekan tumor yang dikenal adalah *p53*, *Retinoblastoma* (RB), *Wilms's Tumor* (WT), *neurofibromatosis* (NF) dan *deleted in colon carcinoma* (DCC).<sup>13,15,16</sup>

*p53* dan *pRB* adalah dua protein yang berfungsi sebagai penekan tumor. Mutasi pada gen yang mengkode keduanya akan menyebabkan proliferasi sel tidak terkontrol dan timbul keganasan.<sup>15,16</sup> Pada sel normal *pRB* akan diinaktivasi oleh fosforilasi dan diaktivasi dephosporilasi. Dua sampai empat jam sebelum fase S dari siklus sel *pRB* akan difosforilasi sehingga tidak aktif dan akan menghambat aktifitas dari  $E_2F$  dan sel akan berhenti pada  $G_1/S$ . *p53* berfungsi pada penghambatan replikasi DNA yang rusak pada fase  $G_1/S$  siklus sel. Pada keadaan normal sel dengan kerusakan DNA akan berhenti pada fase  $G_1/S$ . Pada mutasi *p53* sel dengan kerusakan DNA akan tetap masuk ke fase S dan berproliferasi dengan membawa kerusakan.<sup>15,16</sup>

Selain onkogen dan gen penekan tumor, hilangnya kontrol atas proses apoptosis merupakan suatu hal yang penting dalam proses keganasan. Apoptosis adalah suatu program yang mengatur kematian sel. Apoptosis merupakan proses normal untuk kelangsungan hidup suatu organisme. Proses apoptosis berfungsi untuk menghilangkan sel-sel yang rusak dan membiarkan sel – sel yang berfungsi baik untuk tetap berkembang. Apoptosis juga berguna pada respon imun sebagai mekanisme perlindungan inang.



Kehilangan kontrol pada apoptosis menyebabkan sel berproliferasi tanpa batas kematian.

### 2.1.3. Perubahan Struktur Permukaan Sel Tumor

Sel tumor merupakan sel yang sudah mengalami mutasi dan berubah sifat. Perubahan sifat sel tersebut menyebabkan sel mempunyai sifat-sifat yang berbeda dibandingkan dengan sel normal asalnya. Selain itu juga menyebabkan sel mempunyai kemampuan lain seperti proliferasi yang cepat, immortal dan kemampuan untuk bermetastase ke lain tempat. Beberapa perubahan terjadi pada struktur permukaan sel tumor antara lain <sup>12,17</sup>

- a. Antigen tumor yang dikode oleh genom virus. Tumor yang diinduksi oleh virus biasanya mempunyai genom virus pada genom selnya dan seringkali mengekspresikan protein yang dikode oleh genom virus.
- b. Ekspresi gen yang secara normal tersembunyi. Pembelahan sel tidak terkontrol pada sel kanker menciptakan suatu lingkungan dimana produk dari gen yang secara normal tersembunyi akan berekspresi. Kadang-kadang gen tersebut mengkode diferensiasi antigen yang secara normal dihubungkan dengan tahap fetal yang lebih awal. Tumor yang berasal dari tipe sel yang sama sering mengekspresikan oncofetal antigen yang juga ada pada sel embrionik. Sebagai contoh adalah  $\alpha$ -fetoprotein pada karsinoma hepar dan antigen karsinoembryonik (CEA) pada kanker usus.

- c. Antigen mutan karena adanya mutasi titik tunggal pada onkogen dapat ditemukan pada tumor yang diinduksi oleh karsinogen. Gen yang dikode p53 penghambat siklus sel adalah titik untuk mutasi pada kanker dan
- d. Perubahan pada struktur karbohidrat. Sel tumor akan mempresentasikan struktur karbohidrat pada permukaan yang abnormal yang meliputi glikolipid, glikoprotein, gangliosid, antigen golongan darah dan musin.

## **2.2. IMUNOLOGI TUMOR**

Tubuh mempunyai kemampuan untuk bereaksi terhadap adanya antigen sel tumor. Antigen tumor dikelompokkan dalam dua kelompok yaitu : antigen spesifik tumor ( TSA) yang hanya berada dalam tumor dan antigen terkait tumor ( TAA) yang selain terdapat pada sel tumor juga terdapat pada sel normal. Antigen spesifik tumor tersusun dari peptida derivat tumor yang diekspresikan pada permukaan oleh MHC I dan dikenali oleh CD8+ sel T.

### **2.2.1. Mekanisme Lolosnya Sel Tumor dari Sistem Imun Tubuh**

Meskipun sel tumor merupakan sel yang abnormal, namun sel tumor akan menampakkan diri sebagai sel normal untuk menghindari pengenalan sebagai antigen asing oleh sistem imun. Dengan demikian sel tumor dapat lolos dari perusakan oleh sistem imun. Mekanisme lolosnya sel tumor tersebut dapat melalui beberapa mekanisme antara lain :<sup>12</sup>

- a. Ekspresi dari MHC I pada sel tumor dapat ditekan sehingga tidak terbentuk kompleks antigen peptida dengan molekul MHC dan menghindari pengenalan oleh *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL).
- b. Bila sel tumor dapat mengekspresikan kompleks peptida-MHC I, tubuh gagal untuk mengaktivasi CTL karena: 1) sebagian besar sel tumor manusia tidak mengekspresikan molekul MHC II sehingga tidak dapat secara langsung mengaktivasi CD4 dan Th ( T helper), 2) tidak adanya kostimulator sel tumor sehingga tidak dapat mengaktivasi sel T.
- c. Tubuh inang dapat mempunyai toleransi yang tinggi terhadap antigen tumor.
- d. Imunitas terhadap sel tumor dapat menghasilkan adanya mutan dari sel tumor sehingga tumor tidak menghasilkan antigen tumor terutama jika protein antigen tersebut tidak penting untuk tumor.
- e. Adanya modulasi antigen yaitu hilangnya ekspresi permukaan antigen tumor sebagai hasil dari ikatan antibodi, merupakan kekebalan sel tumor terhadap mekanisme efektor sistem imun.
- f. Antigen permukaan sel tumor dapat disembunyikan dari sistem imun oleh molekul glikokalik, termasuk asam sialik yang mengandung mukopolisakarida.

### 2.2.2. Sistem Imun Terhadap Sel Tumor

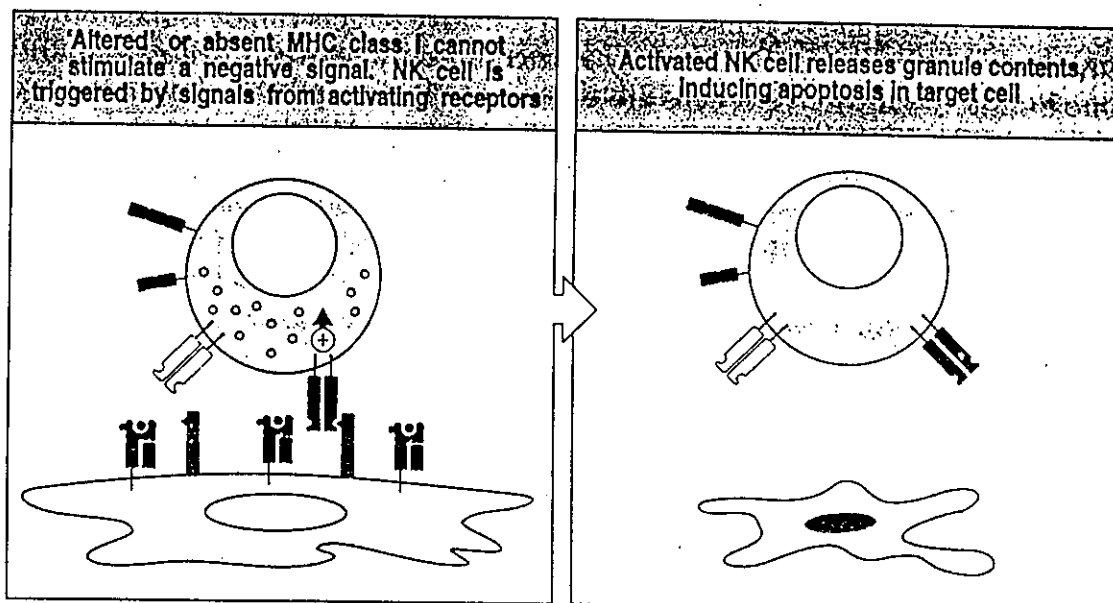
Efektor terhadap sel tumor dapat terjadi melalui imunitas seluler maupun humoral. Imunitas seluler lebih berperan dibandingkan dengan imunitas humoral walaupun antibodi terhadap tumor tetap terbentuk.

Sel tumor dapat dihancurkan oleh sistem imun melalui beberapa mekanisme yang meliputi *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL), makrofag, *Natural Killer Cell* ( sel NK ), *Lymphokine-activated killer* ( LAK ) dan *Antibody - Dependent Cellular Cytotoxicity* ( ADCC ). Peran antibodi dalam menghancurkan tumor adalah melalui sel efektor *Antibody- Dependent Cellular Cytotoxicity* ( ADCC) yang memiliki reseptor Fc misalnya sel NK dan makrofag atau dengan jalan mencegah adhesi sel tumor.<sup>12</sup>

Fungsi limfosit T sebagai efektor terhadap tumor diperankan oleh sel limfosit sitotoksik ( CTL). Sel *T helper* (Th) berfungsi dalam induksi dan regulasi CTL tetapi tidak berfungsi dalam destruksi sel tumor. Sel Th dapat diaktivasi oleh antigen sel tumor dan akan memproduksi *tumor necrosis factor* (TNF) dan interferon- $\gamma$  ( IFN- $\gamma$ ) yang dapat meningkatkan ekspresi MHC-I dan sensitivitas terhadap lisis oleh CTL. Fungsi destruksi dimiliki oleh CTL karena memiliki spesifisitas terhadap antigen permukaan sel tumor.<sup>12</sup>

Sebagai sel efektor terhadap tumor, sel NK dapat teraktivasi oleh pengenalan langsung terhadap sel tumor atau oleh sitokin yang diproduksi oleh limfosit -T spesifik tumor. Sel NK dapat melisis sel yang terinfeksi virus maupun sel tumor. Sel NK mempunyai mekanisme untuk membedakan sel yang terinfeksi atau sel yang mengalami kerusakan dengan sel yang normal. Sel NK mempunyai dua reseptor permukaan yang mengatur aktivitas sitotoksiknya. Kedua jenis reseptor tersebut adalah reseptor yang mengaktifkan dan reseptor yang menghambat penghancuran oleh sel NK. Reseptor

penghambat bersifat spesifik terhadap alel MHC kelas I dimana penghancuran sel NK bersifat selektif terhadap sel target yang memiliki kadar molekul MHC kelas I yang rendah. Penurunan ekspresi molekul MHC kelas I merupakan gambaran dari sel yang terinfeksi oleh patogen intrasel.<sup>18</sup>



Gambar 1. Induksi apoptosis oleh sel NK ( diambil dari Janeway CA, Jr )<sup>18</sup>

Mekanisme sel NK dalam melisiskan sel tumor sama dengan mekanisme CTL tetapi sel NK tidak mengekspresikan reseptor antigen sel T. Sel NK akan melepaskan granula sitotoksik ke permukaan untuk berikatan dengan sel target dan protein efektor yang dimilikinya akan menembus membran sel dan menginduksi apoptosis. Kemampuan sel NK menghancurkan sel tumor ditingkatkan oleh adanya sitokin termasuk interferon, TNF, interleukin-2 dan inteleukin-12. Jadi peran sel NK sebagai anti tumor tergantung pada sel T dan makrofag yang memproduksi sitokin tersebut. IL-2 dapat mengaktifasi sel NK dalam pembunuhan sel tumor dengan mekanisme yang disebut *lymphokine-activated killer* ( LAK ). LAK akan menghasilkan perforin yang dapat merusak membran sel tumor. Selanjutnya LAK akan melepaskan *natural killer cytotoxic factor* ( NKCF) yang akan berikatan dengan reseptor NKCF pada sel tumor dan berakibat lisisnya sel.

Antibodi mempunyai peran yang tidak begitu penting bila dibandingkan dengan sel T, akan tetapi antibodi tetap diproduksi untuk melawan antigen tumor. Antibodi yang terbentuk pada beberapa jenis tumor dipergunakan untuk melawan virus, seperti virus EBV pada penderita limfoma. Pada beberapa kasus tubuh memproduksi antibodi untuk melawan tumornya sendiri yang dapat digunakan secara *in vitro* untuk mengidentifikasi antigen tumor.

### **2.2.3. Peran Makrofag dalam Sistem Imun Terhadap Sel Tumor**

Makrofag mempunyai peran yang cukup penting pada imunitas seluler terhadap tumor. Secara *in vitro* makrofag dapat melisiskan sel tumor tetapi tidak melisiskan sel normal.<sup>12</sup> Makrofag mempunyai receptor Fcy dan dapat menjadikan sel tumor yang dilapisi antibodi sebagai sel target. Makrofag yang teraktivasi juga dapat mengeluarkan

*tumor necrosis factor* (TNF) yang dapat membunuh sel tumor tetapi tidak dapat membunuh sel normal. Mekanisme makrofag dalam menghancurkan sel tumor sama dengan mekanisme makrofag dalam menghancurkan organisme penyebab infeksi.

TNF dapat membunuh sel tumor melalui efek toksik langsung maupun tidak langsung pada vaskularisasi sel tumor. Efek toksik langsung tergantung pada ikatan antara TNF dengan reseptor permukaan sel yang mempunyai afinitas tinggi. Dalam hal ini toksisitas terjadi dengan mengaktifasi jalur kematian sel yang mirip dengan kematian sel yang diinduksi oleh ikatan 'Fas ligand' terhadap Fas. Toksisitas dapat juga terjadi karena terbentuknya radikal bebas.

Sel normal akan memberikan respon terhadap TNF dengan mensintesis superoksid dismutase, suatu enzim yang berpartisipasi dalam inaktivasi radikal bebas. Sebaliknya, sel tumor gagal untuk membuat superoksid dismutase dalam responnya terhadap TNF.

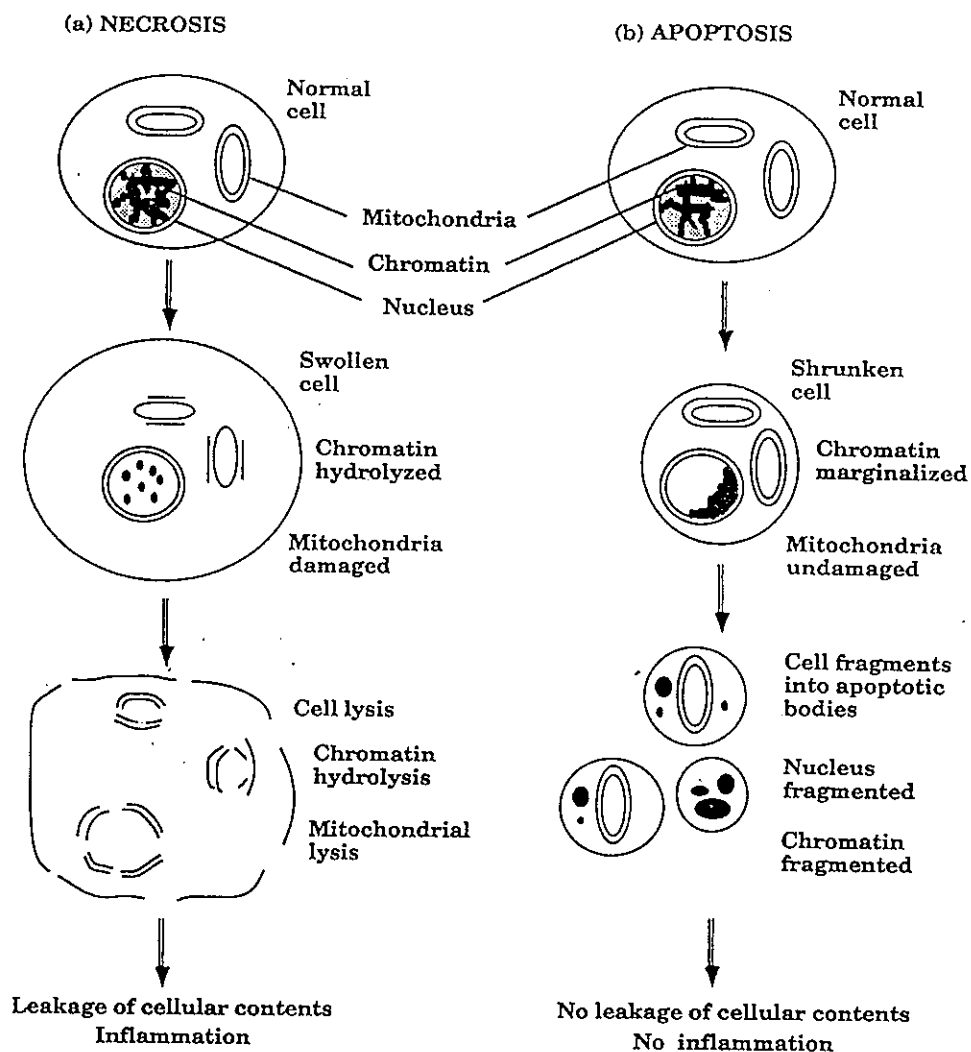
## **2.3. APOPTOSIS**

### **2.3.1. Apoptosis dan Nekrosis**

Apoptosis adalah kematian terprogram dari suatu sel. Apoptosis berbeda dengan nekrosis dimana apoptosis tidak menimbulkan proses inflamasi sehingga apoptosis merupakan bentuk kematian sel yang diharapkan. Apoptosis ini berguna untuk mengeliminasi atau menghilangkan sel-sel yang tidak diinginkan sehingga dapat melindungi organisme atau tubuh dari kerusakan. Apoptosis dapat dipicu oleh beberapa hal misalnya sel dengan kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki oleh sistem repair,

efek hormon glukokortikoid, hipertermi, infeksi dan beberapa faktor pertumbuhan misalnya pada proses remodeling dan tumbuh kembang secara fisiologis.<sup>19</sup>

Perbedaan antara apoptosis dan nekrosis secara morfologi secara sederhana dapat dilihat pada gambar berikut ini :



Gambar 2. Perbedaan morfologi apoptosis dan nekrosis ( diambil dari Stanfield W)



Apoptosis merupakan keadaan dimana sel diinduksi untuk bunuh diri. Induksi tersebut terjadi karena adanya signal yang menyatakan adanya kegagalan dalam mempertahankan sel. Perubahan yang terjadi adalah sel akan mengkerut, kondensasi kromatin sepanjang membran dalam inti dan mitokondrianya menjadi pecah dengan melepas sitokrom-c. Kemudian timbul gelembung seperti bleb pada permukaannya dan terjadi degradasi kromatin yang terdiri dari DNA dan protein pada inti selnya. Sel akan menjadi pecahan – pecahan kecil yang terbungkus membran. Phospholipid phosphatidil serin yang secara normal tersembunyi dalam membran plasma terekspos keluar pada permukaan dan kemudian ini diikat oleh reseptor pada sel fagosit seperti makrofag. Perubahan morfologi pada apoptosis secara nyata adalah adanya lekukan pada untai DNA pada daerah sekitar antara nukleosom. Hasil fragmentasi nukleosomal ini dapat dilihat dengan elektroforesis agarose gel.

Nekrosis merupakan kerusakan sel oleh trauma seperti kerusakan mekanis dan paparan kimiawi yang bersifat toksik. Nekrosis memberikan perubahan khas pada sel dimana seluruh organelnya termasuk mitokondria akan membengkak karena tidak berfungsinya kemampuan membran plasma untuk mengontrol lalu lintas ion dan air. Kemudian terjadi fragmentasi organela sel dan hidrolisis kromatin. Akibatnya kandungan sel keluar dan menyebabkan inflamasi pada jaringan sekitar. Nekrosis disertai dengan degradasi DNA secara acak dan digesti histon.<sup>20</sup>

### 2.3.2. Protein-Protein yang Berperan Pada Apoptosis

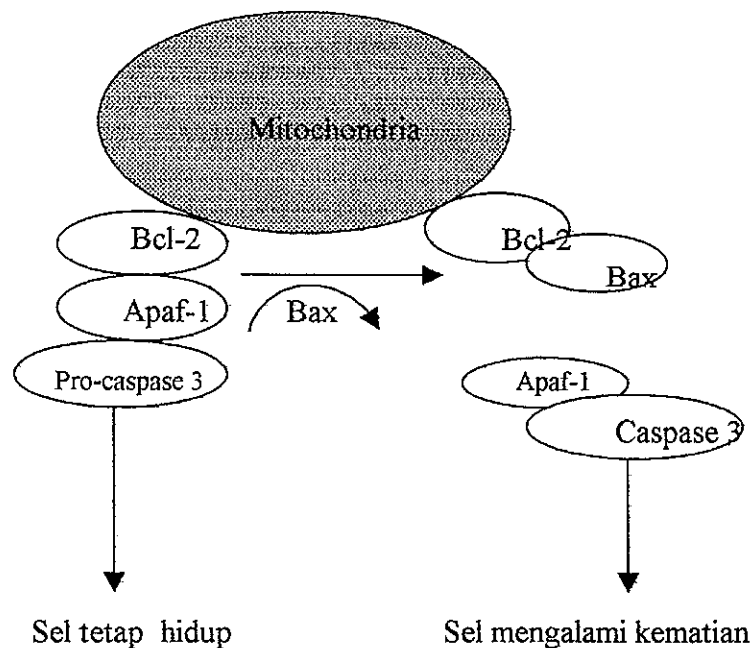
Apoptosis adalah kejadian kompleks yang melibatkan sejumlah komponen. Apoptosis dikendalikan oleh banyak protein. Protein – protein tersebut dapat bersifat pro apoptosis seperti *Bax*, maupun anti apoptosis seperti *Bcl-2* dan *Bcl-6*.<sup>18,20,21</sup> Selain itu masih ada serangkaian kelompok protein kaspase dimana kaspase yang satu akan mengaktifkan kaspase yang lain membentuk kaskade kaspase.<sup>19,22</sup> Juga ada peran reseptor permukaan seperti *Fas* dan reseptor *TNF* serta sitokrom-C.<sup>22</sup>

Kelompok protein *Bcl-2* pada mamalia homolog dengan protein anti apoptosis *Ced-9* dan pro-apoptosis *egl-1* pada *C. elegans*.<sup>15,22</sup> Kelompok protein *Bcl-2* terdiri dari kelompok pro-apoptosis dan kelompok anti apoptosis. Protein yang termasuk dalam kelompok pro apoptosis adalah *Bax*, *Bad* dan *Bid*, sedang *Bcl-2* dan *Bcl-xl* digolongkan dalam kelompok anti apoptosis. Anggota *Bcl-2* yang terbaru adalah *Bcl-2-L-10* yang merupakan kelompok anti apoptosis. *Bcl-2-L-10* dapat menghambat apoptosis yang diinduksi oleh *IL-3* dan ekspresi *Bax* dengan mencegah pelepasan sitokrom-c, aktivasi kaspase-3 dan kolaps potensial membran pada mitokondria. Tetapi *Bcl-2-L-10* tidak menghambat apoptosis yang diinduksi oleh *TNF- $\alpha$* .<sup>23</sup>

Dengan menggunakan kristalografi dapat diklasifikasikan berdasarkan struktur domainnya. *Bcl-2* dan *Bcl-XL* mempunyai 4 domain yaitu : *BH1*, *BH2*, *BH3* dan *BH4*. *Bax* hanya *BH1*, *BH2* dan *BH3* sedangkan *Bad* dan *Bid* hanya terdiri dari *BH3*. *Bcl-2-L-10* memiliki domain *BH4*, *BH1* dan *BH2* tetapi tidak punya *BH3*.<sup>22</sup>

Pemahaman tentang struktur kristal kelompok protein *Bcl-2* dapat membantu mengetahui fungsi protein ini. Digambarkan bahwa domain *BH1*, *BH2* dan *BH3* membentuk sebuah ‘kantong’ yang dapat mengikat domain *BH3* dari anggota kelompok

protein Bcl-2 yang lain sehingga dapat membentuk homodimer dan heterodimer. Karena sifatnya tersebut maka dapat diperkirakan bahwa anggota Bcl-2 pro-apoptosis dapat mengikat anggota Bcl-2 anti apoptosis untuk menggantikan kedudukan Apaf-1.<sup>24</sup>



Gambar 3. Pembentukan heterodimer antara Bcl-2 dengan Bax menginisiasi apoptosis

Pada sel normal permukaan membran luar mitokondria akan mengekspresikan protein Bcl-2 yang mengikat molekul protein *Apaf-1* dan pro-kaspase3 dan membentuk suatu kompleks yang akan menyebabkan sel tetap hidup. Jika ada anggota protein Bcl-2 dari kelompok pro-apoptosis, maka bcl-2 dapat membentuk heterodimer dan

menyebabkan lepasnya ikatan antara *Apaf-1* dengan Bcl-2. Keadaan tersebut akan mengaktivasi pro-kaspase 3 menjadi kaspase 3 dan menginisiasi kematian sel melalui kaskade kaspase.

*Apaf-1* membutuhkan 2 co-faktor untuk menjadi aktif yaitu : ATP dan sitokrom-c. Sitokrom-c pada keadaan normal berada pada ruang intermembran pada mitokhondria dan berperan dalam rantai transport elektron dan fosforilasi oksidasi. Jika sitokrom-c keluar ke sitoplasma maka sitokrom-c akan mengikat *Apaf-1* dan menyebabkan aktivasi *Apaf-1*. Keluarnya sitokrom-c ke sitoplasma hanya akan terjadi selama masih ada ketersediaan ATP. Sitokrom-c dapat keluar dari mitokondria karena adanya peran dari protein Bcl-2. Protein anti apoptosis Bcl-2 menghambat pelepasan sitokrom-c dari mitokondria sedangkan protein pro-apoptosis Bcl-2, terutama Bax, menyebabkan pelepasan sitokrom-c dan aktivasi *Apaf-1*.<sup>22</sup>

TNF berasal dari protein yang terlikosilasi. Terdapat dua bentuk yaitu *TNF- $\alpha$*  ( Cachectin) dan *TNF- $\beta$*  ( Limphotoksin) yang merupakan protein sejenis. *TNF- $\alpha$*  disintesis oleh monosit dan makrofag sedang *TNF- $\beta$*  diproduksi terutama oleh limfosit. *TNF- $\alpha$*  dan *TNF- $\beta$*  dapat mengikat reseptor yang sama, tetapi dengan afinitas yang berbeda. Baik *TNF- $\alpha$*  maupun *TNF- $\beta$*  dapat menginduksi kematian sel terprogram, yang disebut apoptosis pada sel target. Induksi apoptosis dari sel endotel yang melapisi pembuluh darah mengakibatkan kolaps pembuluh darah dan septic shock. Induksi apoptosis pada sel tumor oleh *TNF- $\alpha$*  dan *TNF- $\beta$*  seperti pada endotel dapat menjelaskan bagaimana *TNF- $\alpha$*  dan *TNF- $\beta$*  membunuh tumor. Apoptosis berbeda dengan nekrosis sel. Nekrosis terjadi karena lisis osmotik atau serangan enzimatik dan dihubungkan dengan volume sel. Sel yang sedang apoptosis akan mengerut dan tidak

membengkak, pepadatan kromatin sepanjang inti sel dan tidak menyebar, muncul vacuola yang besar pada sitoplasma dan kemudian menjadi sel kecil-kecil dan tidak pecah-pecah.

### 2.3.3. Jalur Apoptosis

Apoptosis dapat terjadi karena adanya signal internal maupun signal eksternal. Signal internal sebagai contoh adalah adanya kerusakan gen. Adanya kerusakan gen akan segera dikenali oleh gen *p53* dan mengisyaratkan sel untuk berhenti tumbuh sehingga sel dapat melakukan perbaikan atau repair. Kerusakan yang tidak bisa diperbaiki oleh sistem repair akan dideteksi dan kemudian *p53* mengisyaratkan bahwa sel harus apoptosis untuk mencegah adanya pertumbuhan yang tidak beraturan.

Adanya signal internal ini akan menyebabkan lepasnya ikatan *Apaf-1* pada *bcl-2*. *Apaf-1* kemudian bergabung dengan sitokrom-C dan membentuk apoptosom dengan kaspase-9 dan ATP. Protein struktural dalam sitoplasma akan didigesti dan terjadi degradasi dari DNA pada kromosom yang diakhiri dengan kematian sel.

Signal eksternal dapat berupa sinar ultraviolet, sinar infra red, infeksi bakteri dan virus. Reseptor *Fas* dan reseptor *TNF* adalah protein integral pada membran yang terpapar pada permukaan sel. *Fas* dan *TNF* akan membentuk ikatan komplementer yang disebut *death activator* yang memberikan signal ke sitoplasma dan mengaktivasi kaspase 8. Kaspase 8, seperti juga kaspase 9 akan menginisiasi jalur kaspase, membentuk kaskade kaspase dan menyebabkan kematian sel.

Jalur signal transduksi pada sel dapat menuju kepada pertumbuhan sel normal atau menuju kepada sel apoptosis. Hidup atau matinya sel ditentukan oleh kuatnya signal

seperti yang diinduksi oleh norepinefrin ( NEPI) dan *Epidermal Growth Factor* (EGF) yang merupakan jalur signal transduksi untuk menghambat apoptosis. Pengaruh kuatnya signal penghambatan ini berlaku juga untuk stimulasi yang juga dipengaruhi oleh kuatnya signal ( seperti interferon- $\gamma$  dan TNF) yang menstimulasi jalur signal transduksi untuk menginduksi kematian sel terprogram atau apoptosis sebagai berikut :

- a) Ikatan norepineprin pada reseptor permukaan sel akan menginisiasi signal Mdm2 untuk menghambat *p53* sehingga inhibitor yang lain seperti *p21* tidak disintesis. Akibatnya Cdk-G1 dan antigen proliferasi inti sel (*pcna*) tidak dihambat. Penghambatan *p53* dan keberadaan dari Cdk-G1 cyclin yang aktif dan *pcna* akan menstimulasi proliferasi sel dan menghambat kematian sel terprogram. Ikatan EGF terhadap reseptornya akan menginisiasi signal yang berbeda . Penghambatan Rb melalui fosforilasi melepaskan faktor transkripsional (E2F) yang mendukung sintesis dari aktivator transkripsional ( *Fos*, *Jun*, *Myc*). Transkripsional aktivator ini menstimulasi pembentukan *bcl-2* dan *Bax* yang merupakan protein penting untuk pemeliharaan sel untuk tetap hidup normal . Protein *bcl-2* dan *bax* merupakan protein yang menghambat apoptosis.
- b) Ikatan interferon dan TNF pada reseptor respektifnya akan menginisiasi signal yang mengaktivasi protein phosphatase untuk mende phosphorilasi berbagai protein. Dephosphorilasi dari protein kinase pengaktif mitosis ( MAPK) oleh phosphatase dapat menghambat aktivasi dari aktivator transkripsional seperti *Fos*, *Jun*, dan *Myc*. Selain itu juga menghambat transkripsi gen *bcl-2* sehingga tidak terbentuk protein *bcl-2*. Tidak adanya protein *bcl-2* akan menyebabkan terjadinya

apoptosis. Dephosphorilasi oleh phosphatase dari protein penghambat ( Mdm2) juga mengaktifkan p53 yang mendukung program kematian sel.

#### 2.3.4. Gambaran Apoptosis

Peristiwa apoptosis secara selular mempunyai gambaran yang karakteristik dimana sel akan dirontokkan dalam suatu bentuk *apoptotic bodies* ( badan apoptosis) yang mudah difagosit oleh sel makrofag yang ada disekitarnya dan didegradasi dalam lisosom. Gambaran peristiwa apoptosis dimulai dengan terjadinya penyusutan sel ( *cell shrinkage*) karena adanya pengumpulan dari kromatin dan sitoplasma. Kemudian akan terjadi pecahnya membran sel ( *membran blebbing* ), peningkatan kalsium influks dan terjadinya serangan endonukleotik terhadap DNA yang berada di kromatin pada *internukleosomal*. Phosphatidilserin yang secara normal berada pada permukaan dalam membran sel akan mengalami translokasi melintasi plasma membran dan akan terpapar pada permukaan luar sel. Phosphatidilserin yang berada pada permukaan sel akan teridentifikasi dan menjadikan sel tersebut sebagai target untuk dimusnahkan oleh sistem imun. Phosphatidilserin merupakan petunjuk proses awal apoptosis.

Secara seluler aktivasi protein proapoptosik yang dikoordinasi oleh p53 akan meningkatkan aktifitas penyandian protein-protein enzim protease sitosolik. Protein protease yang disandi antara lain kalpain-1 dan *interleukin-1 $\beta$  converting enzym* (ICE-1). Aktifitas kalpain-1 tergantung pada kalsium. Adanya kedua protein protease tersebut akan merangsang terjadinya suatu reaksi kaskade yang dimulai dengan peningkatan kalsium influks sehingga terjadi peningkatan jumlah protease. Protease akan mengkatalisis degradasi interseluler termasuk fragmentasi DNA dan pemecahan sitoskeleton.

Setelah proses apoptosis berjalan maka hasil akhir adalah terbentuknya *apoptotic bodies* ( badan apoptosis ) yang mengandung beberapa organela dan komponen sitosolik. Badan apoptotis ini akan mengekspresikan reseptor ligan baru yang akan berikatan dengan makrofag untuk memulai suatu proses fagositosis.<sup>18</sup> Badan apoptosis akan difagosit oleh makrofag dengan minimal atau tanpa inflamasi.<sup>20</sup>

#### 2.4. SAMBILOTO ( *ANDROGRAPHIS PANICULATA* ) SEBAGAI ANTI KANKER

Tumbuhan sambiloto secara taxonomi diklasifikasikan dalam divisio *Embryophyta siphonogama*, subdivisio *Angiospermae*, klas *Dicotyledoneae*, ordo *Tubiflorae*, famili *Acanthaceae*, genus *Andrographis* dan jenis *Andrographis paniculata*.<sup>6</sup> Di Indonesia tumbuhan ini juga dikenal dengan nama pepaitan, ki oray, ki peurat, bidara, dan sadilata.<sup>8</sup>



Gambar 4 . Tumbuhan sambiloto ( *Andrographis paniculata* )



*Andrographis paniculata* merupakan tumbuhan terna berbatang tegak dengan banyak cabang kwadangularis, berdaun tunggal berhadapan, daun berbentuk lanset tepi rata, ujung dan pangkal daun tajam, permukaan daun halus, berukuran 3-12 cm x 1-3 cm. Bunga kecil berwarna putih dengan strip ungu berada pada pangkal daun.

Kandungan kimia dalam tumbuhan *Andrographis paniculata* berupa andrografid, andrografolid, neo-andrografid, panikulin, asam kersik, damar dan mineral berupa kalium, kalsium dan natrium.<sup>6</sup> Kandungan aktif andrografid dan andrografolid mempunyai rasa yang sangat pahit. Zat aktif ini dapat diekstrak dari daun kira-kira 2,5 – 4,6 % dari bobot kering.<sup>6</sup> Andrografolid sebagian besar terikat pada protein plasma dan sebagian masuk ke dalam sel. Kadar maksimum dalam plasma dicapai dalam waktu yang relatif cepat yaitu 1,5 – 2 jam pada pemberian oral, sedangkan waktu paruh berkisar antara 6,6 – 10 jam.<sup>24</sup> Andrografolid diakumulasi dalam jaringan otak, ginjal, jantung dan paru. Andrografolid diabsorpsi dan diekskresi dari tubuh secara cepat kurang lebih 80% dalam 8 jam dan 90% dalam 48 jam.

Secara tradisional *Andrographis paniculata* telah banyak digunakan sebagai obat termasuk untuk infeksi HIV dan antikanker. Beberapa penelitian eksperimental laboratorium membuktikan bahwa pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* mempunyai efek antihistaminergik,<sup>26</sup> penghambatan tukak lambung karena indometasin.<sup>10</sup> Sebagai imunostimulator ekstrak *Andrographis paniculata* dapat menstimuli produksi antibodi spesifik terhadap sel darah domba dan meningkatkan reaksi alergi tipe lambat. *Andrographis paniculata* juga meningkatkan kemampuan migrasi makrofag dan kemampuan fagositosis terhadap E.coli. Aktivitas proliferasi limfosit yang diisolasi dari limpa juga mengalami peningkatan.<sup>27</sup>

Sebagai anti HIV, andrografolid telah dicobakan pada relawan yang positif terinfeksi virus HIV dan relawan yang normal. Andrografolid diberikan pada dosis 5 mg/kg berat badan selama 3 minggu, kemudian dinaikkan menjadi 10 mg/kg berat badan selama 3 minggu dan terakhir 20 mg/kg berat badan selama 3 minggu. Hasil signifikan didapatkan pada kadar CD4 limfosit pada dosis diatas 10 mg/kg berat badan.<sup>28</sup>

Pemberian *Andrographis paniculata* pada tikus yang terpapar karsinogen memberikan hasil bahwa potensi *Andrographis paniculata* sebagai kemopreventif terhadap kemotoksitas karsinogen.<sup>29</sup> Efek anti kanker dari ekstrak *Andrographis paniculata* diperoleh karena sifatnya sebagai imunostimulator melalui dua cara yaitu: 1) sebagai respon antigen spesifik dimana antibodi yang dibuat untuk melawan mikroorganisme, 2) respon imun nonspesifik dimana sel makrofag akan merusak sel pengganggu. *Andrographis paniculata* juga sangat efektif untuk mengobati *malignant tropoblast*. Dari 60 kasus khorioikarsinoma dan mola hidatidosa ganas, dimana 41 kasus telah mengalami metastase, setelah pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* 41 kasus mencapai remisi jangka pendek.<sup>11</sup>

Sebagai antikanker ekstrak methanol/ methylene chloride dari *Andrographis paniculata* dapat memicu proses apoptosis melalui jalur *interleukin- converting enzyme* (ICE-1) dan mereduksi aktifitas *tyrosine kinase* dengan memanfaatkan zat aktifnya yaitu andrografolid.<sup>30</sup> Namun belum ada laporan tentang penggunaan ekstrak air dari *Andrographis paniculata* dalam memicu proses apoptosis.

Walaupun *Andrographis paniculata* memiliki sifat toksik tetapi penggunaan dalam dosis yang wajar tidak membahayakan. Keamanan penggunaan *Andrographis*

*paniculata* diuji dengan menentukan LD50 pada mencit dan didapatkan kadar lebih dari 215 mg/kgBB ekstrak. Harga ini relatif besar sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa dalam penggunaan yang wajar tidak menimbulkan bahaya.

## B A B 3

### KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

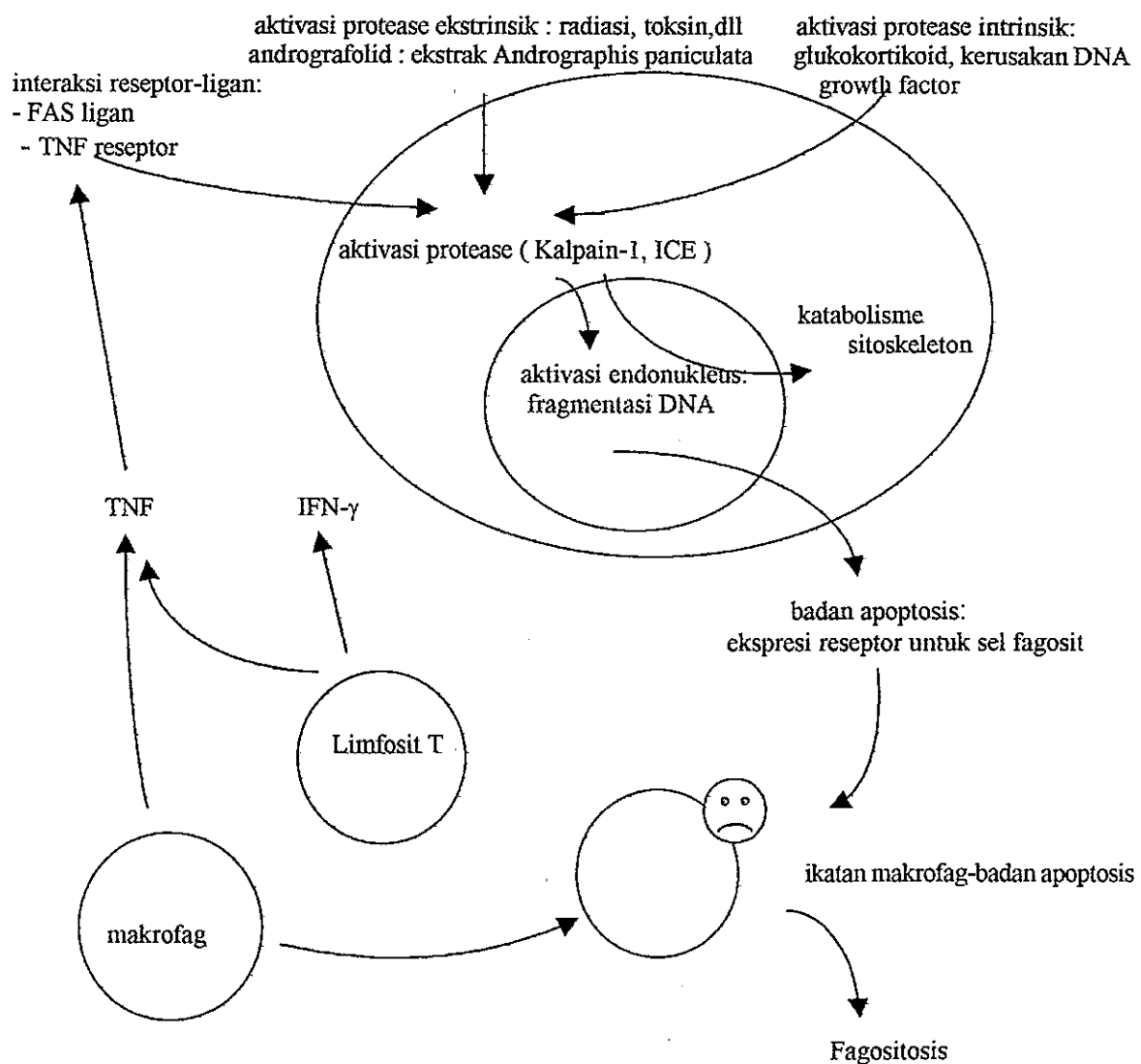
#### 3.1. LANDASAN TEORI

Apoptosis sebagai kematian sel terprogram dapat diinduksi maupun dihambat oleh faktor-faktor dari luar maupun dari dalam. Faktor intrinsik dapat berupa proses embriogenesis, glukokortikoid, penurunan mendadak faktor pertumbuhan dan kerusakan DNA. Faktor dari luar dapat berupa radiasi sinar ultra violet, radikal bebas toksin dan zat-zat kimia lain. Adanya ikatan antara Fas dan reseptor TNF juga merupakan salah satu sinyal untuk terjadinya apoptosis. Sinyal atau ligan disintesis oleh kompleks protein proapoptosis. Adanya sinyal tersebut akan meningkatkan aktifitas penyediaan protein-protein enzim protease sitosolik. Protein protease yang disandi antara lain adalah *Calpain-1* dan *interleukin-1 $\beta$  converting enzymes* (ICE-1). Kedua protein tersebut akan merangsang terjadinya suatu reaksi kaskade untuk proses apoptosis. Peningkatan aktifitas protease memerlukan kalsium sehingga akan meningkatkan kalsium influks yang akhirnya terjadi peningkatan kuantitas protease. Protease akan mengkatalisis degradasi intraseluler sehingga terjadi fragmentasi kromatin di nukleus dan pemecahan sitoskeleton. Hasil akhir dari proses ini adalah terbentuknya badan apoptosis (apoptotic bodies) yang mengekspresikan reseptor baru untuk berikatan dengan makrofag dan memulai proses fagositosis. Sel yang mengalami apoptosis pada fase awal dapat dilihat dibawah mikroskop fluoresen dengan menggunakan pengecatan Acridine Orange. Untuk

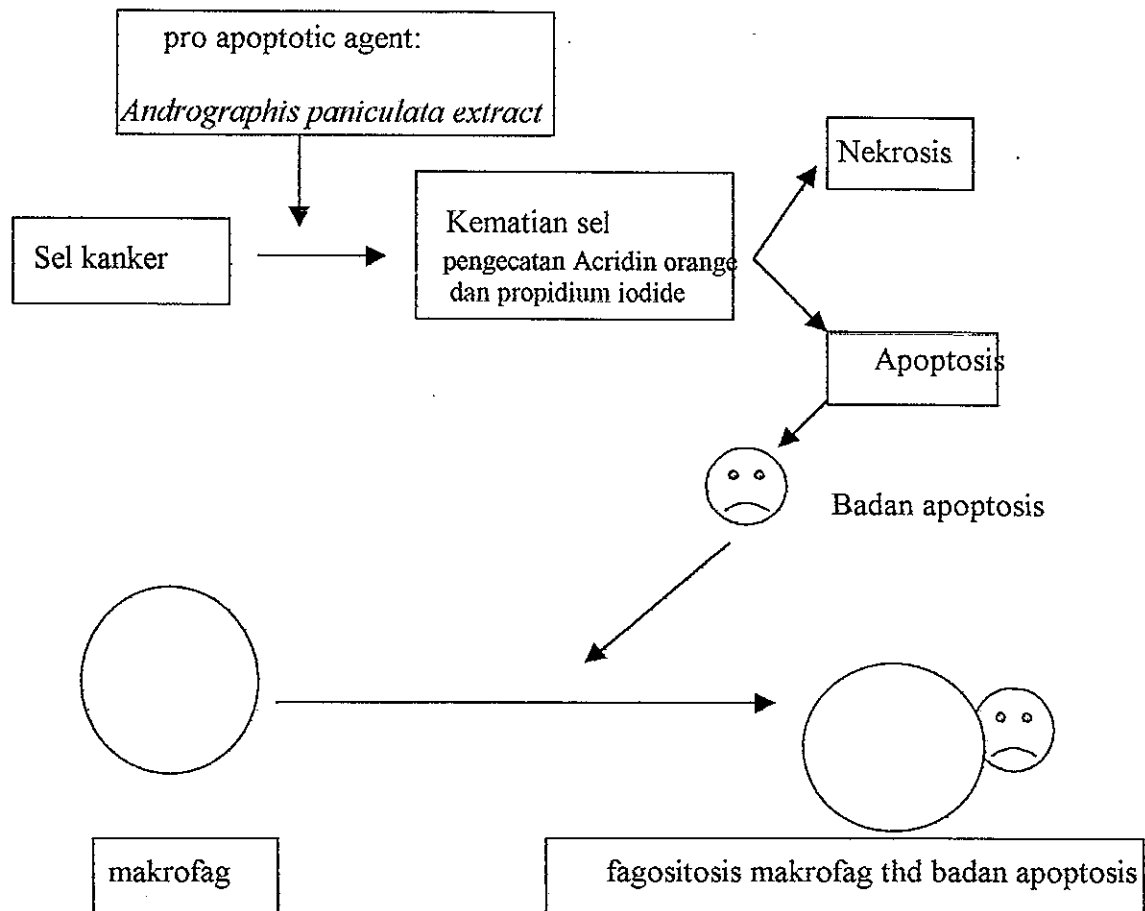
membedakan dengan kematian sel karena nekrosis atau proses lanjut dari apoptosis digunakan pengecatan Propidium Iodide.

### 3.2. KERANGKA TEORI

Dari sumber-sumber pustaka tentang proses keganasan, apoptosis dan beberapa laporan penelitian tentang khasiat ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata*) maka disusunlah kerangka teori sebagai berikut:



### 3.3. KERANGKA KONSEP



Alasan pemilihan kerangka konsep:

1. Kematian sel baik melalui apoptosis maupun nekrosis sebagai hasil akhir dari proses dapat menggambarkan mekanisme kerja sambiloto terhadap sel kanker.
2. Adanya ikatan antara badan apoptosis dengan makrofag dapat menggambarkan adanya proses fagositosis oleh makrofag terhadap sel kanker.

3. Adanya keterbatasan dana dan fasilitas untuk melakukan penelitian keseluruhan parameter.

### 3.4. HIPOTESIS

Hipotesis dari penelitian ini adalah :

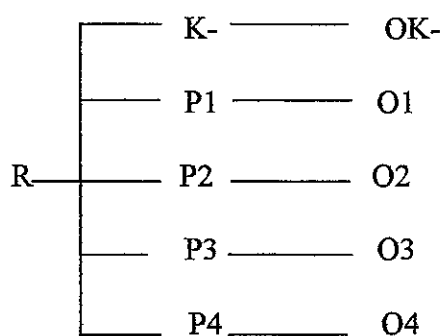
1. Pemberian ekstrak sambiloto ( *Andrographis paniculata* ) akan meningkatkan kematian sel adenokarsinoma mammae terutama melalui jalur apoptosis
2. Jumlah makrofag yang memfagosit badan apoptosis dari sel adenokarsinoma mamma pada kultur yang diberi ekstrak *Andrographis paniculata* lebih banyak dibandingkan kultur kontrol yang hanya diberi media saja.

## B A B 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian pra eksperimental laboratorik dengan desain penelitian adalah *Post Test Randomized Control Group Design*. Perlakuan untuk penelitian pra eksperimental laboratorik ini adalah pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* pada sel adenokarsinoma mamma secara in vitro yang dirancang dengan skema sebagai berikut:



Keterangan :

- R : Randomisasi
- K- : Kelompok kontrol negatif
- P1 : Perlakuan kelompok 1
- P2 : Perlakuan kelompok 2
- P3 : Perlakuan kelompok 3
- P4 : Perlakuan kelompok 4



- OK- : Pengukuran kelompok kontrol negatif
- O1 : Pengukuran kelompok perlakuan 1
- O2 : Pengukuran kelompok perlakuan 2
- O3 : Pengukuran kelompok perlakuan 3
- O4 : Pengukuran kelompok perlakuan 4

## 4.2. POPULASI DAN SAMPEL

1. Populasi penelitian adalah sel Adenokarsinoma mamma yang diambil dari mencit C3H.
2. Sampel penelitian adalah sel adenokarsinoma mamma mencit C3H yang dikultur dan dikontrol secara ketat yang meliputi :
  - Sterilitas, baik sterilitas ruangan, alat, bahan dan peneliti
  - Kelayakan peralatan, penggunaan peralatan yang memenuhi standart pemeliharaan kultur sel dan penelitian
  - Pemeliharaan, kontrol terhadap ketersediaan media RPMI 1640 dalam kultur, suhu inkubator CO<sub>2</sub> 37° C, kadar CO<sub>2</sub> 5%.

## 4.3. VARIABEL PENELITIAN

### 4.3.1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak *Andrographis paniculata*. Ekstrak yang diberikan merupakan ekstrak air yang diberikan dalam satuan mg/ml. Dosis yang diberikan adalah dosis 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml dan dosis 100 mg/ml. Pemberian ke dalam sumuran menggunakan mikropipet.

#### 4.3.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah sel adenokarsinoma mamma yang mengalami kematian setelah pemberian ekstrak *Andrographis paniculata*, yang diketahui dengan :

- a. Sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis
  - Cara pengukuran : Menghitung sel yang mengalami apoptosis dengan pengecatan acridine orange (AO) dan sel yang mengalami nekrosis atau apoptosis lanjut dengan pewarnaan Propidium Iodide. Acridine orange adalah pengecatan khusus yang digunakan untuk mengidentifikasi perubahan kromatin yang berhubungan dengan apoptosis pada sel dengan membran yang masih utuh. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan mikroskop fluoresen. Jumlah sel dihitung dalam satuan sel/lapangan pandang kecil.
- b. Fagositosis makrofag terhadap badan apoptotik
  - Cara pengukuran : menghitung jumlah makrofag yang memfagosit badan apoptotik pada 200 sel makrofag.

#### 4.4. BAHAN

1. Ekstrak *Andrographis paniculata* berupa ekstrak air yang diperoleh dari Laboratorium Kimia Farmasi ITB.
2. Sel adenokarsinoma mamma diperoleh dari mencit jenis C3H yang telah diimplantasi sel Adenokarsinoma mammae dan tumbuh selama 1 bulan. Mencit diperoleh dari Bagian Patologi Anatomi FK UI.
3. Makrofag diambil dari peritoneum mencit C3H yang tidak bertumor

4. Media RPMI 1640 + Gentamicyn + Fungizone
5. Acridin Orange (AO) diperoleh dari Sigma
6. Propidium Iodide (PI) diperoleh dari Sigma
7. Tripsin
8. Larutan FBS
9. Larutan PBS
10. Giemsa 20%
11. Methanol
12. Ethanol 70%
13. Sodium pentobarbital, 50 mg/ml

#### **4.5. ALAT/INSTRUMEN PENELITIAN**

1. Microwell 24
2. Mikroskop Fluoresen
3. Laminar Air flow
4. Incubator CO
5. Sentrifus
6. Neubuer Improve
7. pipet dan mikropipet
8. alat bedah minor
9. coverslip bulat
10. Kaca benda
11. Timbangan analitik

12. mikroskop cahaya

13. Kamera mikro

#### **4.6. WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN**

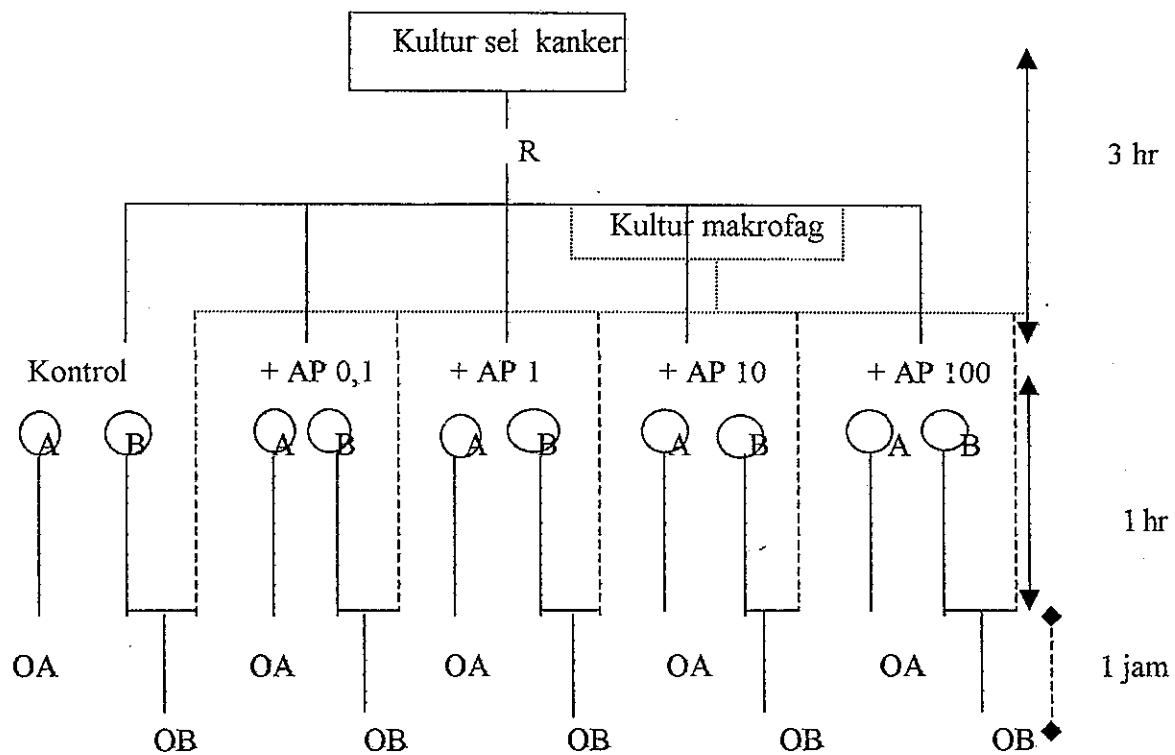
Penelitian ini dilakukan selama 12 minggu pada bulan September 2002 sampai November 2002. Penelitian dilakukan di laboratorium patologi eksperimental bagian Patologi Anatomi FK UI.

#### **4.7. PROSEDUR PENGUMPULAN DATA**

- Kultur sel adenokarsinoma mammae yang sudah stabil dimasukkan ke dalam 50 sumuran pada mikrowell 24 yang telah diisi media RPMI 1640 lengkap dengan FBS, Gentamicyn dan Fungizone.
- Setiap sumuran diisi sel kanker payudara sejumlah kurang lebih  $10^5$  sel.
- Ke 50 sumuran tersebut dibagi secara acak menjadi 5 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 10 sumuran untuk 2 pengukuran, kematian sel dan fagositosis makrofag, dengan masing-masing 5 sumuran. Sumuran untuk pengukuran kematian sel diberi label A dan sumuran untuk pemeriksaan fagositosis makrofag diberi label B.
- Mikrowell kemudian diinkubasikan dalam inkubator CO suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dengan kadar  $\text{CO}_2$  5% selama 3 x 24 jam.

- Kemudian diberikan perlakuan sebagai berikut :
  - Kelompok I : diberikan medium saja sebagai kontrol negatif
  - Kelompok II : diberikan ekstrak *Andrographis paniculata* dosis 0,1mg/ml
  - Kelompok III : diberikan ekstrak *Andrographis paniculata* dosis 1mg/ml
  - Kelompok IV: diberikan ekstrak *Andrographis paniculata* dosis 10 mg/ml
  - Kelompok V: diberikan ekstrak *Andrographis paniculata* dosis 100 mg/ml
- Mikrowell kembali diinkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub>, suhu 37°C, kadar CO<sub>2</sub> 5% selama 1x 24 jam
- Pengamatan terhadap kematian sel kanker dilakukan setelah inkubasi 24 jam pada well A<sub>5</sub>
- Pada sumuran B ditambahkan makrofag sebanyak 10<sup>5</sup> dan diinkubasikan kembali selama 1 jam kemudian dilakukan pengamatan terhadap fagositosis makrofag.

#### 4.8. ALUR KERJA



Keterangan :

+ AP : Pemberian ekstrak *Andrographis paniculata*

OA : Pengukuran kematian sel kanker

OB : Pengukuran fagositosis makrofag

#### 4.9. PEMERIKSAAN

##### 4.9.1. Prosedur Kultur sel Adenokarsinoma dari Mencit

- Jaringan kanker direseksi secara steril dari mencit setelah terlebih dahulu mencit diinhalasi dengan sodium pentobarbitol

- Jaringan kanker dimasukkan dalam cawan petri yang telah diisi media RPMI 1640
- jaringan dicacah sampai mendapatkan sel yang soliter
- Ditambah dengan larutan PBS kurang lebih 2 ml dan disentrifuse pada kecepatan 2500 rpm selama 10 menit.
- Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi kembali dengan PBS
- Disentrifuse kembali pada kecepatan 2500 rpm selama 5 menit
- Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan medium RPMI dan ditanam pada flask yang telah diisi medium RPMI 1640 dengan Gentamicyn dan Fungizone
- Flask diinkubasikan dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C dan kadar CO<sub>2</sub> 5% selama 3 x 24 jam
- Pemanenan dilakukan setelah 3 hari dan dilakukan sub kultur

#### **4.9.2. Prosedur isolasi makrofag peritoneum**

- Mencit dibunuh dengan inhalasi sodium Phenobarbital, kemudian dibaringkan telentang dan seluruh permukaan ventral dibersihkan dengan ethanol 70%
- Dibuat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial abdomen.
- Kemudian kulit dirobek menggunakan 2 pinset ke arah kepala dan ekor mencit sehingga kulit terkelupas dan tampak peritoneum

- Peritoneum dibasahi dengan alkohol 70% untuk menghilangkan bulu-bulu yang rontok
- 2-3 ml RPMI 1640 diinjeksikan ke dalam rongga peritoneum
- Dengan ujung jarum menghadap ke atas/ ventral peritoneum dipijat pelan-pelan. Kemudian diinjeksikan 7-8 ml RPMI. Cairan dalam rongga peritoneum disedot kembali sampai habis dan dimasukkan ke dalam tabung .
- Cairan disentrifus 100 g pada suhu 20<sup>0</sup>C selama 5 menit. Bila terkontaminasi darah dicuci dulu dengan NH<sub>4</sub> Cl 2 kali.
- Makrofag dipurifikasi dengan cara menempatkan sel-sel peritoneal pada permukaan plastik selama 2-4 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C lalu RPMI dituang pelan-pelan untuk menghindari sedimen pelet ikut tertuang. Sel yang dipakai adalah sel yang adheren
- Dilakukan penghitungan jumlah sel per mililiternya
- Ditambahkan medium komplet RPMI 1640 yang telah mengandung Gentamicyn sebagai antibiotik, Fungizone sebagai anti jamur dan 10 % FBS

#### **4.9.3. Prosedur Pembuatan Larutan Ekstrak *Andrographis paniculata***

- Ekstrak *Andrographis paniculata* berupa serbuk kering yang merupakan ekstrak air.
- Ekstrak diperoleh dan distandarisasi di bagian farmasi ITB



- Dilakukan penimbangan ekstrak dengan timbangan analitik sebanyak 1 gr
- Ekstrak dilarutkan dengan PBS sebanyak 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi 100 mg/ml
- Dikocok-kocok sampai terbentuk larutan homogen
- Larutan kemudian disaring dengan menggunakan mikrofilter ukuran 32 sehingga diperoleh larutan tanpa endapan
- Dari konsentrasi 100 mg/ml diambil 1 ml dan ditempatkan pada tabung reaksi
- Kemudian ditambahkan PBS sebanyak 9 ml sehingga diperoleh konsentrasi 10 mg/ml
- Dari larutan konsentrasi 10 mg/ml diambil 1 ml dan ditempatkan pada tabung
- Kemudian ditambah 9 ml PBS sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/ml
- Dari larutan konsentrasi 1 mg/ml diambil 1 ml dan ditambahkan 9 ml PBS sehingga diperoleh konsentrasi 0,1 mg/ml

**4.9.4. Prosedur penghitungan sel yang apoptosis dan nekrosis dengan metode pengecatan ganda menggunakan Acridin Orange dan Propidium Iodide<sup>31</sup>**

- Medium yang telah mengandung sel mati yang melayang diisap dengan menggunakan pipet
- dilakukan sentrifuse pada kecepatan 2500 rpm selama 10 menit
- supernatan dibuang dan ditinggalkan peletnya

- ditambahkan 2 ml PBS dan dilakukan sentrifuse kembali selama 5 menit
- supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan 0,5 ml PBS yang telah mengandung 5µg/ml Acridine orange dan 5µg/ml Propidium Iodide
- Dengan menggunakan pipet dibuat sebaran pada kaca benda
- Dilihat dibawah mikroskop fluoresen , sel yang tampak berfluoresensi warna orange adalah sel yang mengalami apoptosis, sedang sel yang berfluoresensi hijau adalah sel yang nekrosis.
- Sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis dihitung dalam satu lapangan pandang pada pembesaran 400 x.

#### **4.9.5. Prosedur pemeriksaan fagositosis makrofag terhadap badan apoptotik sel adenokarsinoma mamma**

- Suspensi makrofag dicuci 2x dengan RPMI 1640
- masukkan 200 µl ke dalam well yang telah diberi coverslip bulat.  
Ditambahkan medium komplit 1ml/sumuran
- Sel kanker yang diambil dari supernatan ditambahkan ke dalam well yang telah terisi makrofag
- inkubasi selama 60 menit pada inkubator CO dengan kadar CO<sub>2</sub> 5% dan suhu 37° C
- Dicuci 3 kali dengan PBS untuk menghilangkan partikel yang tidak difagosit
- Coverslip dikeringkan pada suhu ruang, kemudian difiksasi dengan methanol selama 10 menit

- Dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit
- dicuci dengan aquadest, angkat dari sumuran dan dikeringkan pada suhu kamar
- dilakukan mounting pada kaca benda
- Pemeriksaan dilakukan pada mikroskop cahaya, dihitung dalam 200 sel

#### **4.10. ANALISA DATA**

Semua hasil yang didapatkan dicatat dan dilakukan analisa data. Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Untuk menguji kenormalan data dilakukan uji Kolmogorov – Smirnov. Data yang mempunyai distribusi normal dilakukan uji beda keseluruhan kelompok dengan Tukey dan dilanjutkan uji beda antar kelompok dengan T-Test. Nilai signifikansi untuk T-test berulang apabila variable yang dianalisis memiliki nilai  $p < 0,05/\text{jml ulangan}$ .<sup>32</sup> Semua analisis statistik dilakukan dengan menggunakan program SPSS 10.01 for window.

## **B A B 5**

### **HASIL PENELITIAN**

Hasil penelitian ini disampaikan dalam 2 bagian sesuai dengan hipotesisnya

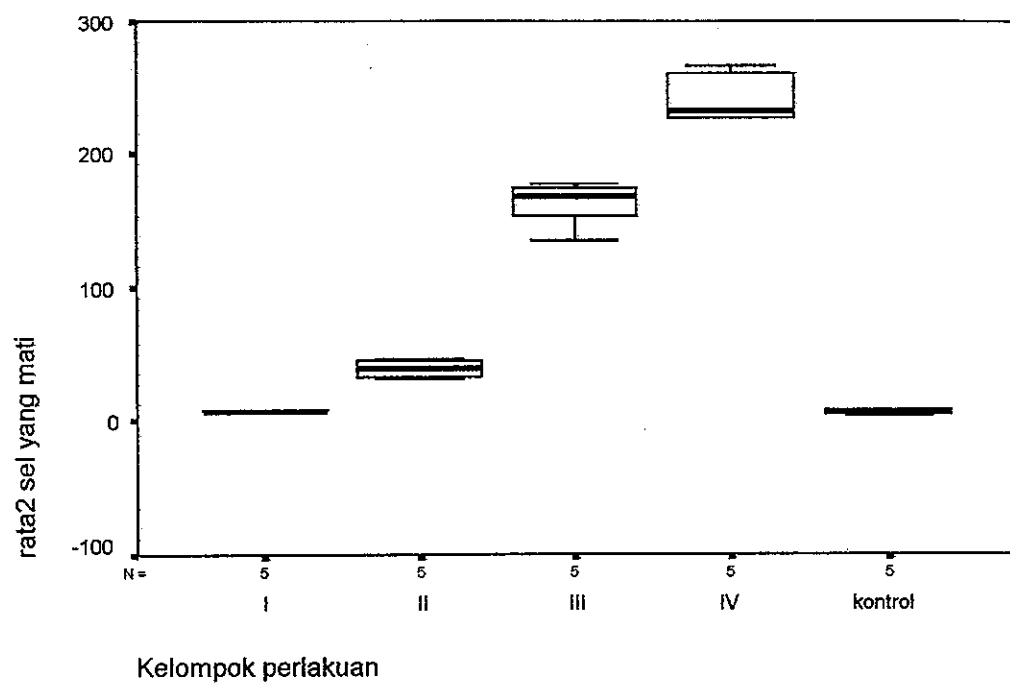
#### **5.1. KEMATIAN SEL**

Kematian sel pada penelitian ini dibedakan menjadi kematian sel yang berupa apoptosis dan kematian nekrosis. Untuk membedakan digunakan pewarnaan ganda menggunakan Acridine orange dan Propidium Iodide. Pada pemeriksaan dengan mikroskop fluoresen akan terlihat sel yang berfluoresen warna orange adalah sel yang mengalami apoptosis, sedang yang berfluoresen warna hijau adalah sel yang nekrosis atau mungkin juga apoptosis tahap lanjut.

Pemeriksaan jumlah sel yang mati dilakukan dengan menghitung sel baik yang berfluoresen orange maupun hijau dalam satu lapangan pandang kecil. Sel yang berfluoresen orange dihitung sebagai sel yang mengalami apoptosis, sedang sel yang mengalami nekrosis dihitung sel yang berfluoresen hijau saja. Setelah dilakukan pemeriksaan didapatkan hasil sebagai berikut :

**Tabel 1.** Jumlah sel adenokarsima mamma yang mengalami kematian

Kelompok	N	Minimum	Maksimum	Median	Mean	SD
Kontrol	5	3	8	6	5,8	1,9
Dosis 0,1mg/ml	5	7	10	7	7,8	1,9
Dosis 1 mg/ml	5	31	47	38	38,8	7,0
Dosis 10 mg/ml	5	135	177	168	161,6	17,6
Dosis 100 mg/ml	5	161	267	233	230,0	42,1

**Gambar 5.** Grafik boxplot jumlah sel adenokarsinoma mamma yang mengalami kematian

**Tabel 2.** Hasil uji beda kematian sel adenokarsinoma mamma dengan uji Anova

ANOVA						
SELMATI						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)	205936.4	4	51484.100	120.211	.000
	Linear Term	143298.3	1	143298.346	334.590	.000
	Contrast	62638.054	3	20879.351	48.752	.000
Within Groups	Deviation	8565.600	20	428.280		
Total		214502.0	24			

**Tabel 3.** Hasil uji Post Hoc sel adenokarsinoma mamma yang mati dengan uji Tukey

SELMATI					
Subset for alpha = .05					
DOSIS	N	1	2	3	
Tukey HSD <sup>a</sup>					
.00	5	5.80			
.10	5	7.80			
1.00	5	38.80			
10.00	5		161.60		
100.00	5			230.00	
Sig.		.125	1.000	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Pada tabel 1 tampak bahwa kematian sel adenokarsinoma mamma yang terjadi setelah pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* meningkat berbanding lurus dengan dosis yang diberikan. Kematian sel adenokarsinoma mamma paling sedikit didapat pada kelompok kontrol, sedang paling banyak pada pemberian ekstrak dosis 100 mg/ml. Dengan uji Kolmogorov-Smirnov data yang didapatkan memberikan gambaran distribusi yang normal ( lampiran 2).

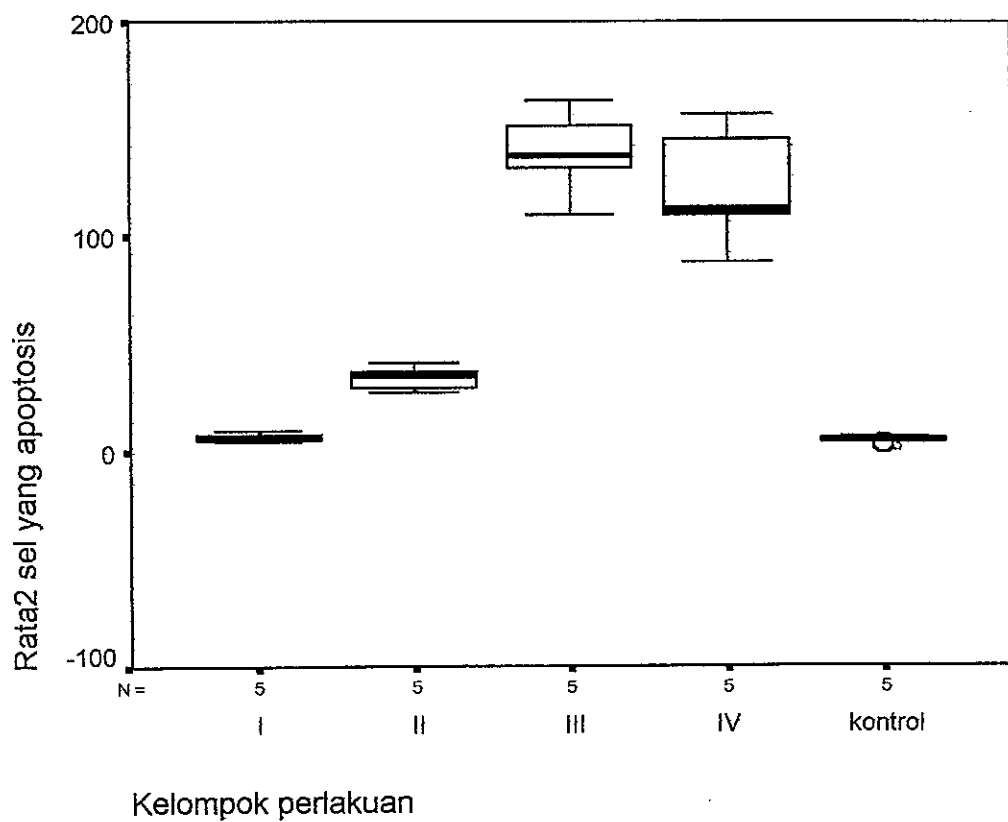
Pada grafik boxplot yang tersaji tampak bahwa sel yang mati pada dosis 0,1 mg/ml dan dosis 1 mg/ml berada pada posisi yang berdekatan dengan posisi kontrol, sedang kelompok yang lain berada pada posisi yang cukup jauh dari kelompok kontrol. Dari grafik tersebut dapat diperkirakan bahwa sel yang mati pada pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* dosis 0,1 mg/ml dan dosis 1 mg/ml tidak berbeda bermakna bila dibandingkan dengan sel yang mati pada kontrol. Sedangkan sel yang mati pada dosis 10 mg/ml dan dosis 100 mg/ml akan memberikan beda yang bermakna disbanding dengan kelompok kontrol.

Perbedaan antar kelompok secara keseluruhan yang dianalisa dengan Anova menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai  $p < 0,0001$ . Uji beda dilanjutkan dengan test Tukey. Pada test Tukey tampak bahwa mean dari kelompok kontrol, dosis 0,1 mg/ml dan dosis 1 mg/ml berada pada satu subset yang sama yang berarti tidak ada beda yang signifikan antara ketiga kelompok tersebut. Sedangkan kelompok dosis 10 mg/ml dan kelompok dosis 100 mg/ml berada pada subset yang berbeda dengan kelompok kontrol. Uji dilanjutkan dengan melihat perbedaan masing-masing kelompok dengan menggunakan T-test. Pada T-test berulang nilai signifikansi berdasarkan cara Bonferroni adalah  $p < 0,05/5$  yaitu  $p < 0,01$ .<sup>32</sup> Hasil yang tidak signifikan didapat pada kelompok kontrol dengan kelompok yang diberikan dosis *Andrographis paniculata* 0,1 mg/ml dengan nilai  $p = 0,09$ .

Hasil pemeriksaan dan penghitungan sel adenokarsinoma mamma yang mengalami apoptosis adalah sebagai berikut :

**Tabel 4.** Jumlah sel yang mengalami apoptosis

Kelompok	N	Minimum	Maksimum	Median	Mean	SD
Kontrol	5	3	7	5	5,2	1,4
Dosis 0,1 mg/ml	5	5	10	6	7,0	2,0
Dosis 1 mg/ml	5	28	41	35	42,2	5,2
Dosis 10 mg/ml	5	110	163	138	139,0	20,2
Dosis 100 mg/ml	5	88	157	113	122,8	28,1

**Gambar 6.** Grafik boxplot sel adenokarsinoma mamma yang mengalami apoptosis



Tabel 5. Hasil uji beda sel yang apoptosis dengan uji Anova

ANOVA						
APOPTOSI						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)	83245.360	4	20811.340	84.079	.000
	Linear Term	80799.275	1	30799.275	124.431	.000
	Contrast					
	Deviation	52446.085	3	17482.028	70.629	.000
Within Groups		4950.400	20	247.520		
Total		88195.760	24			

Tabel 6. Hasil uji post hoc sel yang apoptosis dengan uji Tukey

APOPTOSI				
Subset for alpha = .05				
	DOSIS	N	1	2
Tukey HSD <sup>a</sup>	.00	5	5.20	
	.10	5	7.00	
	1.00	5	34.20	
	100.00	5		122.80
	10.00	5		139.00
	Sig.		.059	.498

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Pada penelitian ini jumlah sel yang mengalami apoptosis paling sedikit terdapat pada kelompok kontrol, sedang paling banyak adalah kelompok yang mendapat *Andrographis paniculata* dosis 10 mg/ml yaitu sebesar  $139,0 \pm 20,2$  sel/lapangan

UPT-PUSTAK-UNDIP

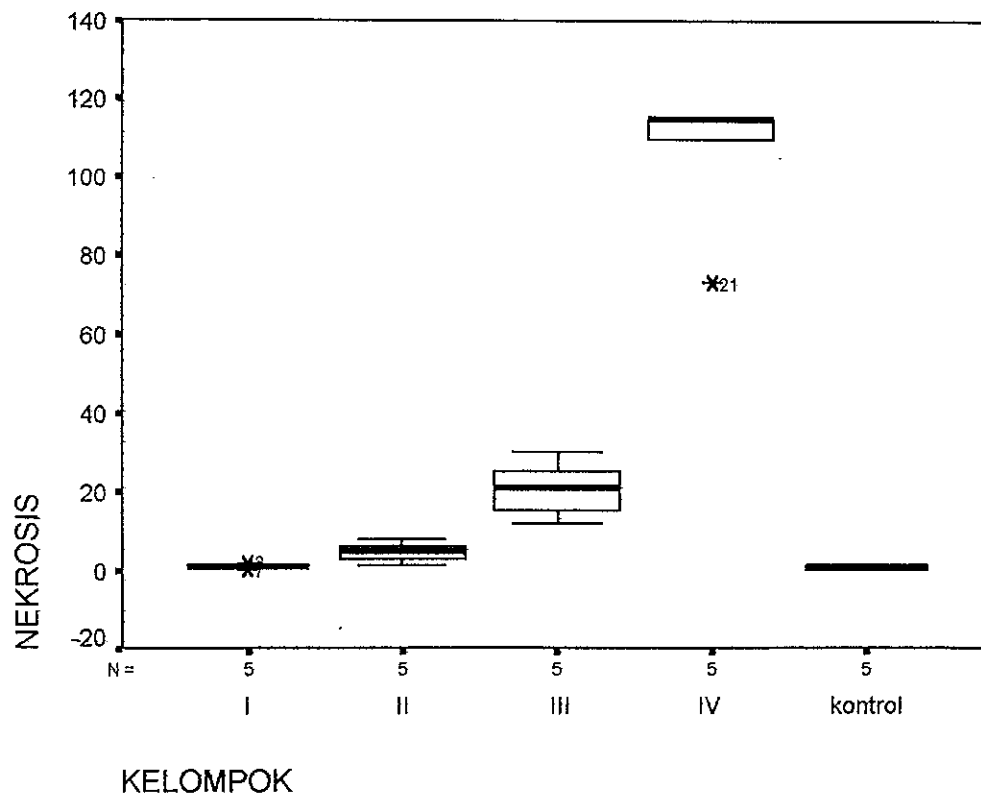
pandang kecil. Sebaran data yang diuji dengan Kolmogorov-Smirnov menunjukkan distribusi normal (lampiran 2).

Dari grafik boxplot dapat dilihat bahwa rata – rata sel yang mengalami apoptosis pada dosis 0,1 mg/ml dan dosis 1 mg/ml berada pada posisi yang berdekatan dengan kelompok kontrol. Dapat diperkirakan kemungkinan sel yang apoptosis pada kedua dosis tersebut tidak berbeda secara bermakna dibanding dengan sel yang apoptosis pada kelompok kontrol.

Setelah dilakukan analisa statistik dengan menggunakan Anova didapatkan perbedaan yang bermakna ( nilai  $p < 0,0001$ ) pada jumlah sel yang mengalami apoptosis antar kelompok percobaan yang terdiri 5 kelompok. Uji antar kelompok selanjutnya dilakukan dengan T-test dengan nilai signifikansi bila  $p < 0,05/5 = 0,01$ . Pada uji T-test didapatkan perbedaan yang tidak signifikan (nilai  $p = 0,145$  ) pada kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat *Andrographis paniculata* dosis 0,1 mg/ml dan antara kelompok yang mendapat *Andrographis paniculata* dosis 10 mg/ml dengan dosis 100 mg/ml dengan nilai  $p = 0,327$ .

**Tabel 7.** Jumlah sel yang mengalami nekrosis

Kelompok	N	Minimum	Maksimum	Median	Mean	SD
Kontrol	5	0	2	1	0,6	0,8
Dosis 0,1 mg/ml	5	0	2	1	0,8	0,8
Dosis 1 mg/ml	5	1	8	5	4,6	2,7
Dosis 10 mg/ml	5	12	30	21	20,6	7,3
Dosis 100 mg/ml	5	73	123	115	107,2	19,9



**Gambar 7.** Grafik boxplot sel adenokarsinoma mamma yang nekrosis

**Tabel 8.** Hasil uji beda sel yang nekrosis dengan uji Anova

ANOVA						
NEKROSIS						
			Sum of Squares	df	Mean Square	F
Between Groups	(Combined)		1737.600	4	10434.400	116.300
	Linear Term	Contrast	1437.800	1	41437.800	461.857
		Deviation	299.800	3	99.933	1.114
Within Groups			1794.400	20	89.720	
Total			3532.000	24		
						Sig.
						.000
						.000
						.367

**Tabel 9.** Hasil uji post hoc sel yang nekrosis dengan uji Tukey

NEKROSIS				
DOSIS	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Tukey HSD <sup>a</sup> .00	5	.60		
.10	5	1.00		
1.00	5	4.60	4.60	
10.00	5		20.60	
100.00	5			107.20
Sig.		.961	.095	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

Penghitungan jumlah sel yang mengalami nekrosis paling sedikit didapatkan pada kelompok kontrol, sedang paling banyak pada kelompok sel kanker yang mendapat *Andrographis paniculata* dosis 100 mg/ml yaitu sebesar  $107,2 \pm 19,6$  sel /lapangan pandang kecil. Distribusi data dengan Kolmogorov-Smirnov menunjukkan adanya sebaran data yang normal.

Pada grafik boxplot yang tersaji tampak bahwa kelompok dosis 0,1 mg/ml dan kelompok dosis 1 mg/ml berada pada posisi yang hampir sama dengan kelompok kontrol. Dapat diperkirakan bahwa kedua kelompok tersebut tidak akan memiliki beda yang bermakna disbanding dengan kelompok kontrol. Sedang kelompok dosis 10 mg/ml dan 100 mg/ml berada pada posisi yang jauh dari kelompok kontrol dan diperkirakan keduanya memiliki beda yang bermakna disbanding kelompok kontrol.

Analisa statistik dengan Anova menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (nilai  $p < 0,0001$ ) antar kelompok percobaan yang terdiri dari 5 kelompok. Post hoc test dengan Tukey tampak bahwa kelompok kontrol, dosis 0,1 mg/ml dan dosis 1mg/ml

berada pada satu subset, sedang kelompok 10 mg/ml dan kelompok dosis 100 mg/ml masing-masing berada pada subset yang lain.

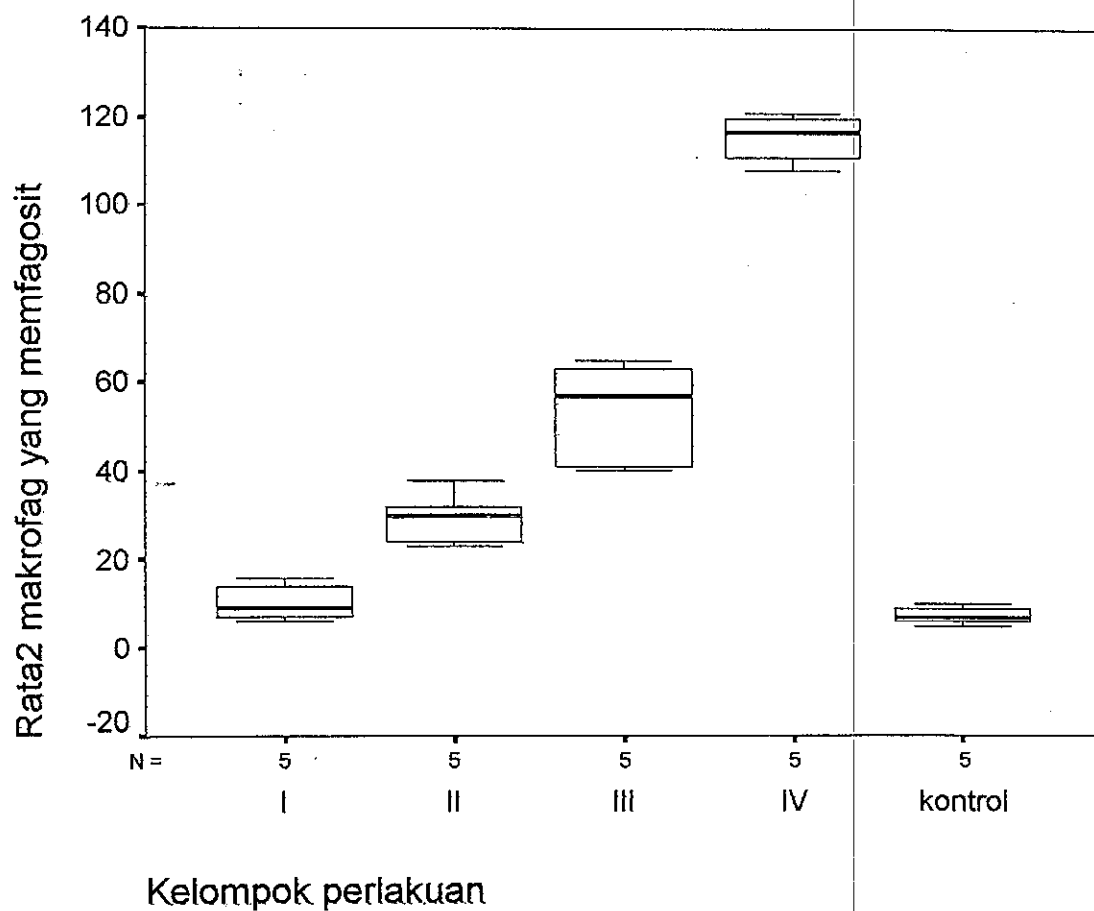
Perbedaan lebih lanjut antar kelompok dilakukan dengan uji T-test. Nilai signifikansi untuk t-test berulang apabila  $p < 0,05/5 = 0,01$ . Pada uji ini perbedaan yang tidak signifikan didapatkan antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat *Andrographis paniculata* dosis 0,1 mg/ml ( nilai  $p = 0,724$  ), kelompok kontrol dengan kelompok dosis 1 mg/ml ( nilai  $p = 0,014$ ), kelompok dosis 0,1 mg/ml dengan kelompok 1 mg/ml ( nilai  $p = 0,017$ )

## 5.2. FAGOSITOSIS MAKROFAG

Fagositosis makrofag terhadap badan apoptosis dihitung dengan cara menghitung makrofag yang memfagosit badan apoptosis pada 200 sel makrofag. Penghitungan dilakukan dengan mikroskop cahaya pada pembesaran 400 X. Setelah dilakukan pembacaan dengan teliti diperoleh hasil sebagai berikut :

**Tabel 10.** Rata-rata makrofag yang memfagosit badan apoptosis

Kelompok Percobaan	N	Minimum	Maksimum	Median	Mean	S D
Kontrol	5	5	10	7	7,4	2,0
Dosis 0,1 µg/ml	5	6	16	9	10,4	4,4
Dosis 1 µg/ml	5	23	38	30	29,4	6,1
Dosis 10 µg/ml	5	40	65	57	52,2	13,6
Dosis 100 µg/ml	5	108	121	117	115,4	5,7



**Gambar 8.** Grafik boxplot makrofag yang memfagosit badan apoptosis

**Tabel 11.** Hasil uji beda fagositosis makrofag dengan uji Anova

ANOVA					
FAGOSIT					
		Sum of Squares	df	Mean Square	Sig.
Between Groups	(Combined)	9303.760	4	9825.940	.000
	Linear Term	34980.997	1	34980.997	.000
	Contrast	4322.763	3	1440.921	.000
	Deviation				
Within Groups		947.600	20	47.380	
Total		10251.360	24		

**Tabel 12.** Hasil uji post hoc fagositosis makrofag dengan uji Tukey**FAGOSIT**

DOSIS	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Tukey HSD <sup>a</sup> .00	5	7.40			
.10	5	10.40			
1.00	5		29.40		
10.00	5			53.20	
100.00	5				115.40
Sig.		.957	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Pada tabel 10 tampak bahwa jumlah makrofag yang memfagosit badan apoptosis berbanding lurus dengan dosis *Andrographis paniculata*. Jumlah makrofag yang paling sedikit memfagosit badan apoptosis adalah pada kelompok kontrol yaitu rata-rata  $7,4 \pm 2,0$  makrofag / 200 sel makrofag sedang terbanyak pada kelompok yang mendapat pemberian *Andrographis paniculata* dosis 100 mg/ml yaitu sebesar  $115,4 \pm 5,6$  makrofag/ 200 sel. Distribusi data yang diuji dengan Kolmogorov-Smirnov menunjukkan adanya sebaran data yang normal ( lampiran 2).

Pada grafik boxplot yang tersaji tampak bahwa kelompok dosis 0,1 mg/ml berdekatan letaknya dengan kelompok kontrol, sementara kelompok yang lain tersebar berjauhan. Dari grafik tersebut dapat diperkirakan kemungkinan bahwa dosis 0,1 tidak mempunyai beda bermakna dibandingkan dengan kontrol, sedangkan dosis yang lain akan memiliki beda bermakna dengan kontrol.

Setelah dilakukan analisis statistik dengan Anova terdapat perbedaan yang signifikan (nilai  $p < 0,0001$ ) pada jumlah makrofag yang memfagosit badan apoptosis antar kelompok percobaan yang terdiri dari 5 kelompok.

Post hoc test dengan Tukey menunjukkan antara kelompok kontrol dengan kelompok dosis 0,1 mg/ml berada pada satu subset yang sama. Perbedaan antar kelompok selanjutnya diuji dengan T-test. Pada T-test berulang, menurut Bonferroni nilai signifikan apabila  $p = 0,05 / \text{jumlah ulangan}$ . Jadi nilai signifikansi apabila nilai  $p < 0,5/4 = 0,0125$ .<sup>32</sup> Pada uji T-test didapatkan perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat *Andrographis paniculata* dosis 0,1 mg/ml dengan nilai  $p = 0,205$ . Uji antar kelompok yang lain menunjukkan hasil yang signifikan.



## B A B 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1. KEMATIAN SEL

Pada penelitian ini kematian sel didapatkan paling banyak pada pemberian *Andrographis paniculata* dosis 100 mg/ml, sedang paling sedikit pada kelompok kontrol. Uji antar kelompok menunjukkan adanya perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok kontrol dengan pemberian *Andrographis paniculata* dosis 0,1 mg/ml, sedang kelompok perlakuan lain menunjukkan perbedaan yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan yang lain.

Hasil tersebut sesuai dengan hipotesa bahwa kematian sel adenokarsinoma mamma akan lebih banyak didapatkan pada kelompok perlakuan yang mendapat *Andrographis paniculata* dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa besarnya dosis berpengaruh terhadap jumlah sel yang kanker yang mati dimana kematian sel semakin meningkat berbanding lurus dengan peningkatan dosis. Hal ini menunjukkan bahwa *Andrographis paniculata* mempunyai efek sitotoksik terhadap sel adenokarsinoma mamma secara in vitro.

Penelitian lebih lanjut dilakukan untuk membedakan antara kematian sel karena apoptosis dan nekrosis menggunakan pewarnaan ganda. Hasil yang didapat menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada jumlah sel adenokarsinoma mamma yang mengalami apoptosis. Uji selanjutnya dengan T-test untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok. Perbedaan yang tidak signifikan didapatkan antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat *Andrographis paniculata* dosis 0,1 mg/ml dan

kelompok yang mendapat *andrographis paniculata* dosis 10 mg/ml dengan yang mendapat 100 mg/ml. Hal ini mungkin terjadi karena pada dosis 0,1mg/ml *Andrographis paniculata* belum memberikan efek yang memadai. Hasil ini sesuai dengan hasil yang didapatkan Tauhid NA yang menunjukkan bahwa andrografolid mulai berefek pada dosis 1 mg/ml dan apoptosis sel terbanyak didapatkan pada dosis 100 mg/ml.<sup>30</sup> Penelitian tersebut menggunakan zat aktif andrografolid dan adrografid untuk menginduksi apoptosis sel line jenis MCF-7, MDA-231 dan H647. Apoptosis sel secara morfologi terdeteksi 24 jam setelah pemberian andrografid dan andrografolid pada kultur sel. Sel mulai tampak mengerut, lepas dari dasar sumuran dengan kontur yang lembut. Kondensasi kromatin tampak dengan adanya granulasi pada inti sel. Setelah lebih dari 24 jam mulai tampak gelembung pada permukaan sel dan krenasi dari inti yang akan menyebabkan fragmentasi sel membentuk badan apoptotik.

Secara seluler aktivasi protein proapoptosik yang dikordinasi oleh p53 akan meningkatkan aktifitas penyandian protein-protein enzim protease sitosolik. Protein protease yang disandi antara lain kalpain-1 dan *interleukin-1 $\beta$  converting enzym* (ICE-1). Aktifitas kalpain-1 tergantung pada kalsium. Adanya kedua protein protease tersebut akan merangsang terjadinya suatu reaksi kaskade yang dimulai dengan peningkatan kalsium influk sehingga terjadi peningkatan jumlah protease. Protease akan mengkatalisis degradasi interseluler termasuk fragmentasi DNA dan pemecahan sitoskeleton.

Hasil yang didapat pada pewarnaan Propidium Iodide untuk melihat sel yang nekrosis menunjukkan adanya perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat *Andrographis paniculata* dosis 0,1 mg/ml dan dosis 1 mg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa pada dosis tersebut *Andrographis paniculata* tidak

menginduksi nekrosis atau menginduksi secara minimal. Pada dosis yang lebih tinggi yaitu 10 mg/ml jumlah sel yang nekrosis makin meningkat. Perbedaan yang signifikan didapatkan pada pemberian *Andrographis paniculata* dosis 100 mg/ml.

Bila dibandingkan antara jumlah sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis, tampak bahwa sel yang mengalami apoptosis lebih banyak pada dosis yang sama. Hasil ini menunjukkan bahwa *Andrographis paniculata* lebih menginduksi apoptosis dibandingkan dengan nekrosis. Akan tetapi pada dosis 100 mg/ml jumlah sel yang mengalami apoptosis tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan dosis 10 mg/ml sementara pada sel nekrosis justru terjadi peningkatan tajam.

Perbedaan yang tidak signifikan pada sel yang mengalami apoptosis antara kelompok yang mendapat *Andrographis paniculata* dosis 10 mg/ml dengan dosis 100 mg/ml bisa terjadi karena beberapa kemungkinan. Kemungkinan yang pertama terjadi karena pada dosis 100 mg/ml terjadi apoptosis lebih awal sehingga setelah 24 jam sel-sel sudah mengalami apoptosis tahap lanjut. Dari beberapa referensi menyatakan bahwa acridine orange hanya akan mewarnai sel-sel yang mengalami apoptosis tahap awal dimana membran sel masih utuh dan tidak mewarnai sel yang sudah mengalami apoptosis tahap lanjut. Apoptosis tahap lanjut dan nekrosis akan terwarnai dengan Propidium iodide.<sup>31</sup> Kemungkinan kedua adalah bahwa pada dosis tersebut *Andrographis paniculata* tidak hanya menginduksi apoptosis tetapi juga menginduksi nekrosis sel.

Terjadinya nekrosis sel pada sel kanker dapat terjadi karena zat aktif *Andrographis paniculata* merupakan zat kimia toksik terhadap sel sehingga dapat merusak membran sel menjadi permeabel terhadap lalu lintas air dan ion. Akibatnya akan terjadi pembengkakan sel dan akhirnya membran sel pecah sehingga isinya akan keluar

sel. Keluarnya isi sel akan merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan fagositosis disertai dengan reaksi inflamasi.

Pada penelitian ini tidak diketahui pengaruh waktu terhadap mulai terjadinya efek sitotoksik karena pemeriksaan hanya dilakukan sekali yaitu 24 jam setelah pemberian ekstrak *Andrographis paniculata*. Untuk mengetahui kapan efek *Andrographis paniculata* mulai memberikan efek sitotoksik masih diperlukan penelitian lebih lanjut dengan desain *time series*. Selain itu pada penelitian ini juga belum diketahui jalur apoptosis yang dapat membunuh sel kanker karena tidak diperiksa parameter lain. Untuk mengetahui jalur kematian sel atau apoptosis diperlukan beberapa pemeriksaan sebagai indikator apoptosis antara lain bcl-2, p53, bax, kaspase dan lain-lain.

## 6.2. FAGOSITOSIS MAKROFAG

Dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap sel tumor makrofag dapat melakukan pembunuhan terhadap sel tumor melalui efek langsung dan tidak langsung. Secara langsung makrofag melisis sel tumor dimana makrofag mengekspresikan reseptor Fc $\gamma$  yang ditujukan terhadap sel tumor yang dilapisi antibodi. Pada mekanisme ini makrofag juga melepaskan enzim lisosom, oksigen reaktif dan nitrit oksid pada tumor. Mekanisme tidak langsung terjadi karena makrofag memproduksi TNF yang dapat membunuh tumor. TNF membunuh tumor melalui efek toksik secara langsung dan melalui efek tidak langsung pada vaskularisasi tumor.

Pada penelitian ini makrofag tidak ditemukan dengan sel tumor yang masih hidup karena penelitian ini tidak bertujuan untuk melihat daya fagositosis makrofag terhadap sel tumor. Dalam penelitian ini jumlah badan apoptosis yang difagositosis oleh

makrofag dimaksudkan untuk melihat bahwa setelah terjadi apoptosis maka sel tumor akan mengalami fragmentasi menjadi badan apoptosis yang dapat dikenali oleh makrofag sebagai antigen asing. Makrofag akan mengenali badan apoptosis sebagai antigen asing karena badan apoptosis mempresentasikan reseptor baru.

Fagositosis makrofag terhadap badan apoptosis merupakan fungsi makrofag sebagai Antigen Presenting Cell (APC). Adanya badan apoptosis akan menyebabkan makrofag teraktivasi. Makrofag tersebut selanjutnya melakukan proses internalisasi terhadap badan apoptosis dan fagositosis.

Jumlah sel makrofag yang memfagosit badan apoptosis pada penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada kelompok – kelompok perlakuan. Hasil tersebut menunjukkan adanya perbedaan jumlah badan apoptosis yang ditambahkan pada well tiap-tiap kelompok. Jumlah badan apoptosis yang difagosit makrofag makin meningkat sesuai dengan peningkatan dosis *Andrographis paniculata* yang diberikan. Pada penelitian ini makrofag tidak mendapat perlakuan sehingga dapat disimpulkan bahwa fagositosis makrofag terhadap badan apoptosis hanya dipengaruhi oleh jumlah badan apoptosis yang ditambahkan pada masing-masing well. Hasil ini menunjang hasil dari penelitian bahwa pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* dapat menginduksi kematian sel adenokarsinoma mamma melalui proses apoptosis.

## B A B 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Ekstrak *Andrographis paniculata* dapat meningkatkan kematian sel adenokarsinoma mamma secara in vitro.
2. Kematian sel yang disebabkan oleh pemberian *Andrographis paniculata* merupakan kematian sel secara apoptosis maupun nekrosis.
3. Pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* pada kultur sel adenokarsinoma mamma juga meningkatkan jumlah badan apoptosis yang difagosit oleh makrofag.

#### 7.2. SARAN

Diperlukan penelitian-penelitian lain yang dapat menunjang hasil penelitian ini seperti: pengaruh waktu pemberian ekstrak, dosis optimal, farmakokinetik dan farmakodinamik dan penelitian –penelitian lain pada binatang ( in vivo ) maupun uji klinik.

## BAB 8

### RINGKASAN

Kanker payudara merupakan penyebab kematian kedua yang disebabkan oleh kanker pada wanita. Terapi kanker yang ada sampai saat ini masih belum memuaskan karena efek sampingnya. Berbagai macam terapi alternatif saat ini berkembang di masyarakat luas untuk penyembuhan kanker seperti akupunktur, gurah dan penggunaan obat tradisional. Obat tradisional berkembang di masyarakat dari pengalaman empiris. Walaupun secara empiris seringkali memberikan hasil yang baik namun penggunaannya seringkali menimbulkan keraguan karena masih sedikitnya bukti – bukti ilmiah yang menunjang. Salah satu obat tradisional yang digunakan sebagai pengobatan kanker adalah tumbuhan sambiloto (*Andrographis paniculata*). Sambiloto sudah banyak digunakan dalam masyarakat untuk pengobatan, tetapi masih sangat sedikit hasil penelitian yang mendukung penggunaan sambiloto untuk pengobatan kanker. Penelitian ini bertujuan menggali lebih dalam efek *Andrographis paniculata* terhadap sel kanker adenokarsinoma mamma mencit C3H dengan melihat efeknya terhadap kematian sel baik apoptosis maupun nekrosis.

Perubahan sel normal menjadi sel kanker terjadi karena adanya mutasi bertingkat yang menyebabkan perubahan perilaku sel. Gen –gen yang mengalami mutasi antara lain adalah onkogen, gen penekan tumor dan gen yang mengatur apoptosis. Onkogen merupakan bentuk aktif dari proto-onkogen. Gen penekan tumor merupakan gen yang mengatur pertumbuhan sel dengan menghambat pertumbuhan yang berlebihan. Bila gen penekan tumor menjadi tidak aktif maka sel akan tumbuh tanpa terkendali. Mutasi pada

gen-gen pengatur apoptosis akan menyebabkan menurun atau hilangnya fungsi apoptosis sel sehingga sel akan terus hidup sepanjang tersedia nutrisi. Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram yang berfungsi untuk menghilangkan sel-sel yang rusak atau sel yang mutasi. Apoptosis dipengaruhi oleh faktor ekstrinsik maupun faktor intrinsik. *Andrographis paniculata* mengandung zat aktif andrografolid yang diperkirakan dapat meningkatkan fungsi apoptosis sel melalui jalur ekstrinsik.

Penelitian ini menggunakan sel kanker adenokarsinoma mamma yang diambil dari mencit jenis C3H. Jaringan kanker yang diambil dikultur pada medium RPMI 1640 yang dilengkapi dengan Gentamycin, Fungizone dan FBS. Kultur dilakukan pada inkubator CO dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , kadar  $\text{CO}_2$  5% sampai sel dalam keadaan stabil. Perlakuan diberikan dengan menambahkan ekstrak *Andrographis paniculata* dosis 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml dan 100 mg/ml dengan pelarut PBS. Sebagai pembanding adalah kultur sel yang hanya diberikan PBS saja. Efek terhadap sel dilihat 24 jam setelah perlakuan. Sel yang apoptosis dan nekrosis dibedakan dengan pengecatan ganda menggunakan Propidium Iodide dan Acridine Orange. Pemeriksaan dilakukan dibawah mikroskop fluorescen. Sel yang apoptosis akan berfluoresensi orange dan sel yang nekrosis akan berfluoresensi hijau. Sel yang apoptosis dan nekrosis dihitung dalam satu lapangan pandang kecil. Fagositosis makrofag diperiksa dengan melihat jumlah makrofag yang memfagosit badan apoptosis dalam 200 sel makrofag.

Hasil pemeriksaan menunjukkan adanya peningkatan jumlah kematian sel, sel yang apoptosis, sel yang nekrosis dan jumlah fagositosis makrofag dibandingkan dengan kelompok kontrol. Secara statistik peningkatan tersebut menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai  $p < 0,0001$ .



Dari hasil penelitian tersebut dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian ekstrak *Andrographis paniculata* dapat meningkatkan kematian sel adenokarsinoma mamma baik melalui secara apoptosis maupun nekrosis. Ekstrak *Andrographis paniculata* juga meningkatkan jumlah fagositosis makrofag terhadap badan apoptosis. Diperlukan banyak penelitian lanjutan untuk dapat menggunakan *Andrographis paniculata* sebagai antikanker.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Berg JW , Hutter RVP. Breast cancer. The American Cancer Society 1995; 75(1):257-69
2. Sarjadi. Data kanker penduduk kodya Semarang dengan perhatian kanker paru. Naskah Seminar sehari Merokok sebagai faktor risiko kanker paru. Semarang. 1996
3. Salmon SE, Sartorelli AC. Cancer Chemotherapy. In: Katzung BG, Editor. Basic & Clinical Pharmacology. 7<sup>th</sup> Ed. San Fransisco:Prentice Hall International:881-915
4. Koosnadi S, Soeprapto M, Roem S. Terapi Biologi Untuk Kanker. Surabaya: Airlangga University Press. 2000
5. Undang-Undang Republik Indonesia No.23 Th 1992 Tentang Kesehatan. dalam Pedoman Profesi Dokter, Masa Kini dan Mendatang. Semarang : Badan penerbit Universitas Diponegoro. 1995
6. Santa IGP. Studi taxonomi sambiloto *Andrographis paniculata* ( Burm.F.) Ness. The Journal on Indonesian Medicinal Plants Vol .3, No.1. 1996
7. Soejono. Sambiloto dan komunitas tumbuhan bawah di sekitarnya. The Journal on Indonesian Medicinal Plants Vol .3, No.1. 1996
8. Anonim. Medicinal Herb Indeks in Indonesia. 2<sup>nd</sup> Ed. Jakarta:PT. Eisai Indonesia. 1995.
9. Budi N, Adjirni, Paramita DI. Beberapa penelitian farmakologi sambiloto. The Journal on Indonesian Medicinal Plants Vol .3, No.1. 1996
10. Afifah B, Sutjiatmo, Sugiarto NC. Efek ekstrak etanol daun sambiloto terhadap tukak lambung yang disebabkan oleh indometasin pada tikus wistar. The Journal on Indonesian Medicinal Plants Vol .3, No.1. 1996
11. Chang HM, But PPH. Pharmacology and applications of Chinese materia medica. Vol.1. World Scientific. 1986.
12. Abbas KA, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 3<sup>rd</sup> Ed. . Philadelphia: WB Saunders Company. 1997
13. Vile RG. Genes and Cancer. In: Basic Moleculer and Cell Biology. 2<sup>nd</sup> Ed. . London: BMJ Publishing Group. 1993:74-93

14. Lehninger. Principal of Biochemistry. 3<sup>rd</sup> Ed. New York: Worth Publisher. 2000
15. Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited. 1996
16. Fuller GM, Shields D. Molecular Basic of Medical Cell Biology. 1<sup>st</sup> Ed. Canada: Appleton & Lange. 1998
17. Roitt I. Essential Immunology. 8<sup>th</sup> Ed. London :Blackwell Science Ltd. 1994
18. Janeway CA, Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology The Immune System in Health And Disease. New York: Garland Publishing. 2001
19. Tauchid Nur Azhar, Indra Wijaya, Ahmad Zulfa. Dasar Biologi Molekuler. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro. 2000
20. Stanfield W, Colome JS, Cano RJ. Molecular and Cell Biology. New York: McGraw-Hill Companies. 1996
21. Krajewski S, Krajewska , Turner BC, Pratt C, Howard B, Zapata JM, et all. Prognostic significance of apoptosis regulator in breast cancer. Endocrine Related Cancer 1999;6:29-40
22. Roben. Bcl-2 family. [www.Geocities.com](http://www.Geocities.com).
23. Zhang H, Holzgreve W, De Geyter C. Bcl-2-L-10, a novel anti-apoptotic member of Bcl-2 family, block apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway. Human Molecular Genetic. 2001
24. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, et. Al. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathway in vivo. Cell. 1998;94
25. Panossian A, et.al. Pharmacokinetic and oral bioavailability of andrographolide from *Andrographis paniculata* fixed combination Kan Jang in rats and human. Phytomedicine. 2000
26. Yufri A, Sugiarto NC, Andreanus, Anna SR. Uji Efek Antihistaminergik dari tanaman *Andrographis paniculata* Ness. The Journal on Indonesian Medicinal Plants Vol 3, No.1. 1996
27. Puri A, Saxena R, Saxena RP, Saxena KS, Srivastava C, Tandon JS. Immunostimulant agent from *Andrographis paniculata*. J Nat Prod 1993;56:7
28. Calabrese C, et al. A phase I trial of andrographolide in HIV positive patient and normal volunteers. Phytother Res 2000;14:5

29. Singh RP, Banerjee S, Rao AR. Modulatory influence of *Andrographis paniculata* on mouse hepatic and extrahepatic carcinogen metabolizing enzymes and antioxidant status. *Phytother Res* 2001;15:5
30. Tauhid NA. Anti cancer properties of several local plant. Tidak dipublikasikan.
31. Bracey. General introduction Bracey's Thesis. [http://members.tripod.co.uk/Tim\\_Bracey/Chap1.htm](http://members.tripod.co.uk/Tim_Bracey/Chap1.htm)
32. Dawson B, Trapp RG. Basic and Clinical Biostatistic. 3<sup>rd</sup> Ed. Singapore: McGraw-Hill Book.2001